

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 884 703**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2006 E 13180503 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.05.2021 EP 2684571**

54 Título: **Propiedades inmunomoduladoras de las células progenitoras adultas multipotentes y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**09.11.2005 US 269736**

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

**10.12.2021**

73 Titular/es:

**ABT HOLDING COMPANY (50.0%)**

**3201 Carnegie Avenue**

**Cleveland, OH 44115, US y**

**OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEANS, ROBERT J.;**

**VAN'T HOF, WOUTER;**

**MAZIARZ, RICHARD;**

**KOVACSOVICS, MAGDALENA y**

**STREETER, PHILIP**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 884 703 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

Propiedades inmunomoduladoras de las células progenitoras adultas multipotentes y usos de las mismas

**Campo de la invención**

5 El campo de la invención es la inmunomodulación de las células progenitoras adultas multipotentes ("CPAM") y su utilización para modular respuestas inmunitarias en terapias primarias y complementarias.

**Antecedentes de la invención**

La utilización terapéutica de trasplantes de órganos, incluyendo trasplantes de medula ósea, se ha incrementado constantemente desde sus primeros inicios. Se ha convertido en una opción terapéutica importante para varias enfermedades, incluyendo, aunque sin limitación, los trastornos hematológicos, inmunitarios y malignos.

10 Desafortunadamente, los usos terapéuticos del trasplante con frecuencia se complican, y resultan ineficaces, o se ven impedidos por respuestas inmunitarias adversas generadas por el trasplante. Entre las reacciones adversas mas prominentes que se encuentran como resultado de las terapias de trasplante se encuentran: (i) la respuesta de huésped contra el injerto ("HCI") (rechazo del trasplante por un huésped inmunocompetente) y (ii) enfermedad del injerto contra el huésped ("EICH") (procesos que se producen principalmente en un huésped inmunocomprometido al resultar reconocido como no propio por células inmunocompetentes de un injerto).

15 El rechazo del injerto en un huésped puede evitarse evidentemente encontrando la correspondencia perfecta entre el donante y el huésped. Sin embargo, excepto por el tejido autólogo, solo podría esperarse que los gemelos idénticos fuesen verdaderamente singénicos. La compatibilidad perfecta entre un donante individual y otro huésped/receptor individual es virtualmente inexistente. De esta manera, la utilización de tejido autólogo es la única otra manera de conseguir una compatibilidad perfecta. Desafortunadamente, el tejido del huésped típicamente no resulta adecuado o no ha sido aislado previamente a resultar necesario. Con frecuencia, la necesidad de la terapia de trasplante es, de hecho, sustituir el tejido dañado en el huésped. Por lo tanto, la utilización de tejidos singénicos, aunque una solución eficaz a los problemas de respuesta adversa del huésped al tejido injertado, no resulta generalmente útil en aplicaciones prácticas.

20 En el caso de que la compatibilidad singénica no resulte posible, los efectos inmunitarios adversos que aparecen en las terapias de trasplante pueden mitigarse haciendo corresponder donante alogénico y huésped el máximo posible. Se utiliza el tipado de sangre y/o tejido para hacer corresponder donantes y huéspedes a fin de proporcionar la máxima probabilidad de éxito terapéutico. Sin embargo, incluso la compatibilidad mas estrecha de tejido alogénico no evita una HCI grave y, por consiguiente, las terapias de trasplante implican la utilización de inmunosupresión y fármacos inmunosupresores, tal como se comenta posteriormente.

25 Otro enfoque para evitar las complicaciones de la HCI en las terapias de trasplante ha sido desactivar el sistema inmunitario del huésped receptor. Ello se ha llevado a cabo mediante la utilización de terapia de radiación, y/o quimioterapia inmunosupresora, y/o terapia de anticuerpos. La supresión resultante de las respuestas inmunitarias del huésped con frecuencia ayuda bastante eficazmente a establecimiento del injerto (tal como medula ósea) en el huésped. Sin embargo, la immunoablación o supresión compromete las defensas inmunitarias del huésped. Lo anterior resulta en que el huésped se torna excesivamente susceptible a infecciones incluso tras una exposición incluso menor a agentes infecciosos. Las infecciones resultantes son una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los pacientes de trasplante.

30 El compromiso del sistema inmunitario del huésped también genera o exacerba otro problema grave que aparece en las terapias de trasplante: la enfermedad del injerto contra el huésped ("EICH"). La EICH se produce en el caso de que el tejido del donante contenga células inmunocompetentes que reconocen las proteínas del CMH del receptor como no propias. Lo anterior activa las células T y secretan citoquinas, tales como IL-2 (interleuquina-2), iFN ((interferón gamma) y TNFV (factor alfa e necrosis tumoral). Estas señales inducen un ataque inmunitario sobre dianas del receptor, incluyendo la piel, tracto GI, hígado y órganos linfoides (Ferrara y Deeg, 1991). La EICH resulta particularmente problematica en los trasplantes de medula ósea, en los que se ha demostrado que esta mediada principalmente por los linfocitos T (Grebe y Streilein, 1976). De hecho, aproximadamente el 50 % de los pacientes de trasplante de medula ósea desarrolla EICH aguda. Muchos de estos pacientes mueren (de 15 % a 45 %).

35 También existen otras disfunciones, trastornos y enfermedades del sistema inmunitario que aparecen como patologías primarias y como efectos secundarios de otras patologías y/o tratamientos de las mismas. Entre ellas se incluyen neoplasmas, patologías de la medula ósea, patologías de la sangre, trastornos autoinmunitarios y algunos trastornos inflamatorios, tal como se comenta adicionalmente después. La terapia primaria y complementaria para estos trastornos y enfermedades, como terapias primarias y complementarias para la HCI y la EICH, con frecuencia implica la utilización de fármacos inmunosupresores. La totalidad de las terapias actuales adolece de desventajas y efectos secundarios

55

Fármacos inmunosupresores

Se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar fármacos para tratar estas disfunciones del sistema inmunitario para mejorar o eliminar sus efectos perjudiciales, sin causar efectos secundarios dañinos adicionales. Se han producido algunos avances hacia este objetivo y se han desarrollado y se utilizan varios fármacos para prevenir y/o tratar dichas disfunciones. La introducción de los mas eficaces de estos fármacos ha marcado un gran avance en la práctica medica de las terapias de trasplante; sin embargo, ninguno de ellos resulta ideal. En efecto, ningunos de los fármacos inmunosupresores actualmente disponibles para la utilización clínica en las terapias de trasplante resulta totalmente eficaz. La totalidad de los fármacos adolecen de graves desventajas y efectos secundarios perjudiciales, tal como se resume brevemente después. Para una revisión, véase Farag, "Chronic graft-versus-host disease: where do we go from here?", Bone Marrow Transplantation 33: 569-577, 2004.

Los corticoesteroides, los cuales se utilizan principalmente para tratar la inflamación y las enfermedades inflamatorias, es conocido que son inmunosupresores y se considera que muchos son el mejor tratamiento primario para la HCl y la EICH. Inhiben la proliferación de las células T y las respuestas inmunitarias dependientes de las células T, por o menos en parte mediante la inhibición de la expresión de determinados genes de citoquina implicados en la activación de las células T y la respuesta inmunitaria dependiente de células T.

La ciclosporina es de los fármacos utilizados mas frecuentemente para la supresión inmunitaria y la prevención de la HCl y la EICH. Es fuertemente inmunosupresora en general. Aunque puede resultar eficaz en la reducción de las reacciones inmunitarias adversas en pacientes de trasplante, también debilita el sistema inmunitario hasta el punto de que los pacientes son altamente vulnerables a las infecciones. En consecuencia, los pacientes resultan infectados con mucha mayor facilidad por la exposición a patógenos, y presentan poca capacidad para montar una respuesta inmunitaria eficaz frente a las infecciones. De esta manera, incluso patógenos moderados pueden ser potencialmente letales. La ciclosporina causa además una diversidad de otros efectos secundarios no deseables.

El metotrexato también se utiliza ampliamente en la profilaxis y el tratamiento de HCl y EICH, por sí solo o en combinación con otros fármacos. Algunos estudios han demostrado que, en caso de que resulte eficaz en absoluto, aparentemente resulta menos eficaz que la ciclosporina. Al igual que la ciclosporina, el metotrexato causa una diversidad de efectos secundarios, algunos de los cuales puede resultar perjudicial para la salud del paciente.

FK-506 es un compuesto de tipo macrólido. De manera similar a la ciclosporina, es de origen fúngico. Los efectos inmunosupresores de la ciclosporina y FK-506 son similares. Bloquean sucesos tempranos de activación de las células T mediante la formación de un complejo heterodimérico con sus proteínas receptoras citoplasmáticas respectivas (es decir, ciclofilina y proteína de unión a FK). A continuación, lo anterior inhibe la actividad de fosfatasa de la calcineurina, inhibiendo finalmente de esta manera la expresión de proteínas reguladoras nucleares y genes de activación de las células T.

Entre otros fármacos que se han utilizado para la inmunosupresión se incluyen la globulina antitimocito, la azatioprina y la ciclofosfamida. No han demostrado ser ventajosos. La rapamicina, otro compuesto de tipo macrólido que interfiere con la respuesta de las células T a IL-2, también se ha utilizado para bloquear la respuesta inmunitaria activada por las células T. RS-61443, un derivado del ácido micofenólico, se ha encontrado que inhibe el rechazo del aloinjerto en animales experimentales. La mizobina, un nucleósido imidazol, bloquea la ruta biosintética de las purinas e inhibe la proliferación de las células T y B estimulada por mitógeno de una manera similar a la azatioprina y RS-61443. La desoxispergualina, un análogo sintético de la espergualina, se ha encontrado que ejerce propiedades inmunosupresoras en modelos preclínicos de trasplante. El antimetabolito Brequinar sódico es un inhibidor de la dihidro-orotato deshidrogenasa y bloquea la formación de los nucleótidos uridina y citidina mediante inhibición de la síntesis de las pirimidinas. La berberina y sus sales farmacológicamente tolerables se han utilizado como un inmunosupresor para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias como el reumatismo, para el tratamiento de alergias y para la prevención del rechazo del injerto. Se ha informado de que la berberina inhibe la producción de anticuerpos de las células B y generalmente suprime las respuestas inmunitarias humores, aunque no afecta a la propagación de las células T. Ver la patente japonesa n° 07-316051 y la patente US n° 6.245.781.

Ninguno de dichos fármacos inmunosupresores, utilizados por sí solos o en combinación con otros agentes, resulta totalmente eficaz. La totalidad de ellos generalmente deja a los pacientes todavía en estado de susceptibilidad a HIC y EICH, y debilita su capacidad de defenderse frente a la infección. Lo anterior los hace mucho mas susceptibles a la infección y mucho menos capaces de combatir infecciones cuando efectivamente se producen. Además, la totalidad de dichos fármacos provocan efectos secundarios graves, incluyendo, por ejemplo, toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, hipertensión, mielosupresión, hepatotoxicidad, hipertensión e hipertrofia gingival, entre otros. Ninguno de ellos ha demostrado ser un tratamiento totalmente aceptable o eficaz. En resumen, dadas dichas desventajas, actualmente no existe ningún tratamiento de base farmacéutica enteramente satisfactorio para la disfunción y/o respuestas adversas del sistema inmunitario, tales como HIC y EICH.

Desde hace mucho que se cree que podría desarrollarse un tipo mas específico de supresión inmunitaria sin dichas desventajas. Por ejemplo, un agente que suprimiese o eliminase las células T alorreactivas, específicamente resultará eficaz contra HIC y EICH (por lo menos en el caso de los injertos alógenicos) sin los efectos secundarios perjudiciales que se producen con agentes que atacan globalmente y comprometen el sistema inmunitario. Sin embargo, hasta el momento todavía no se ha desarrollado ninguno de estos agentes.

Utilización de células madre restringidas en el trasplante

La utilización de células madre en lugar de, o junto con, agentes inmunosupresores recientemente ha despertado interés. Se han realizado algunas observaciones prometedoras en este campo. En los últimos años se ha aislado y caracterizado una diversidad de células madre. El abanico va desde aquellas con un potencial de diferenciación altamente restringido y capacidad limitada de crecer en cultivo, a aquellas con un potencial de diferenciación aparentemente no restringido y una capacidad ilimitada de crecer en cultivo. Las primeras han sido generalmente las más fáciles de obtener y pueden obtenerse a partir de una diversidad de tejidos adultos. Las segundas necesitan derivarse de células germinales y embriones, y se denominan células madre embrionarias ("CME"), células germinales embrionarias ("CGE") y células germinales. La célula madre embrionaria ("CME") posee una capacidad ilimitada de autorrenovación y puede diferenciarse en todos los tipos de tejido. Las células cME se derivan de la masa celular interna del blastocito. Las células germinales embrionarias ("CGE") se derivan de las células germinales primordiales de un embrión postimplantación. Las células madre derivadas de tejido adulto han resultado de valor limitado debido a que son inmunogénicas, presentan un potencial de diferenciación limitado y presentan una capacidad limitada de propagarse en cultivo. Las células CME, CGE y las células germinales no adolecen de dichas desventajas, aunque presentan una tendencia marcada a formar teratomas en huéspedes alogénicos, despertando una justificada preocupación en su uso para tratamientos médicos. Por este motivo, hay pesimismo sobre su utilidad en aplicaciones clínicas, a pesar de su ventajosamente amplio potencial de diferenciación. Las células madre derivadas de embriones también están sometidas a controversias éticas que podrían impedir su utilización en el tratamiento de enfermedades.

Algunos esfuerzos para encontrar una alternativa a las CME, CGE y células germinales se han centrado en células derivadas de tejidos adultos. Aunque se han identificado células madre adultas en la mayoría de tejidos de mamíferos, su potencial de diferenciación está restringido y es considerablemente más estrecho que el de las células CME, CGE y germinales. En efecto, muchas de dichas células pueden dar lugar únicamente a uno o unos cuantos tipos celulares diferenciados, y muchos otros están restringidos a un único linaje embrionario.

Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas pueden diferenciarse únicamente para formar células del linaje hematopoyético; las células madre neurales se diferencian en células únicamente de origen neuroectodérmico, y las células madre mesenquimales ("CMM") están limitadas a las células de origen mesenquimal. Por los motivos indicados anteriormente respecto a las limitaciones, riesgos y controversias relacionadas con las células CME, CGE y germinales, una parte sustancial del trabajo sobre la utilización de las células madre en las terapias de trasplante ha utilizado CMM. Los resultados de los últimos años aparentemente muestran que los aloinjertos de CMM no generan una reacción inmunitaria de HIC, que es una respuesta invariablemente observada al trasplante otros tejidos entre individuos alogénicos. Además, los resultados sugieren que las CMM debilitan la respuesta inmunitaria de linfocitos, por lo menos bajo algunas circunstancias.

Aunque estos resultados inmediatamente sugieren que las CMM podrían resultar útiles para reducir la HIC y/o la EICH que ordinariamente acompañarán al trasplante, los efectos inmunosupresores observados de las CMM eran altamente dependientes de la dosis, y se requerían dosis relativamente elevadas para observar un efecto inmunosupresor. De hecho, una proliferación reducida de linfocitos en ensayos de linfocitos mixtos *in vitro* se encontraba "marcada" únicamente a una proporción igual o superior a 1:10 de CMM a linfocitos. Además, el efecto de inhibición observado se redujo o se volvió no observable a medida que se reducía la dosis de CMM, y a proporciones inferiores a 1:100, la presencia de CMM de hecho aparentemente estimulaba la proliferación de las células T. También se observaron los mismos efectos de la dosis en ensayos de proliferación de linfocitos estimulada por mitógenos. Ver, para una revisión, Ryan et al., "Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection", J. Inflammation 2: 8, 2005; Le Blanc, "Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells", Cytotherapy 5(6): 485-489, 2003, y Jorgensen et al., "Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy", Gene Therapy 10: 928-931, 2003. Se resumen resultados adicionales posteriormente.

Por ejemplo, Bartholomew y colaboradores han encontrado que las CMM de babuino no estimulan la proliferación de los linfocitos alogénicos *in vitro* y que las CMM reducen la proliferación de los linfocitos estimulados por mitógeno en más de 50 % en ensayos de linfocitos mixtos *in vitro*. Mostraron además que la administración de CMM *in vivo* prolongaba la supervivencia de injertos de piel (respecto a los controles). Tanto los resultados *in vitro* como los resultados *in vivo* requerían una dosis elevada de CMM: Proporción 1:1 con los linfocitos para los resultados *in vitro*. La cantidad de CMM que resultará necesaria para aproximarse a dicha proporción *in vivo* en seres humano podría resultar excesivamente elevada, como cuestión práctica. Ello podría limitar la utilidad de las CMM. Ver Bartholomew et al., "Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*", Experimental Hematology 30: 42-48, 2002.

Maitra y colaboradores han examinado los efectos de las CMM humanas sobre la injertación de células de sangre de cordón umbilical humano alogénico tras la coinfusión en ratones NOD-SCID irradiados subletalmente. Encontraron que las CMM humanas fomentaban la injertación y no activaban las células T alogénicas en ensayos de proliferación *in vitro*. También encontraron que las CMM humanas suprimían la activación *in vitro* de células T humanas alogénicas por mitógenos. Los efectos eran dependientes de la dosis y se requerían proporciones relativamente elevadas para la supresión (Maitra et al., Bone Marrow Transplantation 33: 597-604, 2004).

Recientemente, Le Blanc y colaboradores han informado del tratamiento con éxito de un paciente con EICH aguda de

grado IV, que habitualmente resulta fatal, mediante la administración de CMM "haploidénticas de terceros". El paciente era un niño de 9 años con leucemia linfoblástica aguda, que se encontraba en su tercera remisión. Inicialmente, el paciente se trató con radiación y ciclofosfamida y después se le administraron células sanguíneas que eran idénticas a sus propias células en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-DRbeta1. Estas se habían obtenido de un donante hembra no relacionado. A pesar del tratamiento agresivo, incluyendo la administración con una diversidad de inmunosupresores, pasados 70 días del trasplante, el paciente desarrolló EICH aguda de grado IV. Se veía afectado frecuentemente por infecciones invasivas bacterianas, víricas y fúngicas.

Bajo estas claramente malas circunstancias, se intentó un trasplante alternativo de células madre sanguíneas. Se aislaron CMM haploidénticas de la madre del paciente y se expandieron *in vitro* durante tres semanas. Se recolectaron las células y se administraron  $2 \times 10^6$  células por kilogramo en el paciente por vía intravenosa. No se observaron signos de toxicidad asociados a las CMM, ni se produjeron efectos secundarios sustanciales. Muchos síntomas se resolvieron en unos pocos días después del trasplante, aunque era evidente una enfermedad residual. Tras varias inyecciones intravenosas adicionales de CMM utilizando los mismos procedimientos, los síntomas y EICH del paciente se resolvieron por completo. El paciente todavía se encontraba libre de enfermedad un año después del alta. Según los autores, en su experiencia, este paciente es único en el aspecto de sobrevivir a una EICH de esta gravedad. Los resultados informados por Le Blanc et al. resultan tanto prometedores como inspiradores y deberían estimular el desarrollo de terapias eficaces que utilicen células madre. Le Blanc et al., "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells", Lancet 363: 1439-41, 2004.

Sin embargo, estos resultados, incluyendo los de Le Blanc y colaboradores, revelan los potenciales inconvenientes de las CMM. Las células deben administrarse con modalidades inmunosupresoras tradicionales que continuaran generando respuestas inmunitarias perjudiciales. Los requisitos de dosis de las CMM aparentemente necesitarían ser muy elevados para resultar eficaces, incurriendo en mayores costes, mayores dificultades de administración, mayor riesgo de toxicidad y otros efectos secundarios dañinos, y otras desventajas.

En vista de dichas limitaciones de las terapias actuales relacionadas con el trasplante basado en células madre, existe claramente una fuerte necesidad de células progenitoras que puedan utilizarse para todos, o por lo menos la mayoría, de los huéspedes receptores, sin necesidad de un haplotipo de huésped receptor compatible. Además, existe una necesidad de células de mayor "actividad específica", de manera que resulten terapéuticamente eficaces a dosis más bajas y su administración no plantee los problemas asociados a los regímenes de dosis elevadas requeridos para resultados beneficiosos al utilizar las CMM. Además, existe una necesidad de células que presenten un potencial de diferenciación esencialmente ilimitado para formar células que se observen en el organismo de interés.

De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de células que presenten una capacidad de autorrenovación y diferenciación de las células CME, CGE y germinales, aunque no sean inmunogénicos, no formen teratomas al aloinjertarse o xenoinjertarse en un huésped, no planteen otras cuestiones de seguridad asociadas a las células CME, CGE y germinales, conserven otras ventajas de las células CME, CGE y germinales, resulten fáciles de aislar a partir de fuentes fácilmente disponibles, tales como placenta, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, sangre y médula ósea, puedan almacenarse con seguridad durante periodos prolongados, puedan obtenerse fácilmente y sin riesgo para los voluntarios, donantes o pacientes, y otros que proporcionen su consentimiento y no supongan las dificultades técnicas y logísticas que implican la obtención y trabajo con las células CME, CGE y germinales.

Recientemente, se ha aislado y caracterizado un tipo de células, denominado en la presente memoria células progenitoras adultas multipotentes ("CPAM") (ver, por ejemplo, la patente US n° 7.015.037). (Las "CPAM" también pueden denominarse "CMAM"). Estas células proporcionan muchas de las ventajas de las células CME, CGE y germinales sin muchas de sus desventajas. Por ejemplo, las CPAM son capaces de cultivo indefinido sin pérdida de su potencial de diferenciación. Muestran una injertación y diferenciación a largo plazo eficiente junto con múltiples linajes de desarrollo en ratones NOD-SCID, y ello sin evidencias de formación de teratomas (observados con frecuencia con las células CME, CGE y germinales) (Reyes M. y CM. Verfaillie, Ann. N. Y. Acad. Sci. 938: 231-5, 2001).

## Sumario de la invención

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

Según un primer aspecto, la invención proporciona células para su uso en un procedimiento de inmunosupresión en un sujeto, cuyas células son células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), caracterizadas como células madre no embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales, donde las células expresan telomerasa y expresan oct 3/4 y no provocan una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto, en el que las células se administran de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos.

Las células pueden expresar rex-1, rox-1 y sox-2. El potencial celular puede dar lugar a linajes celulares de más de una capa germinal. Las células pueden expresar sox-2, SSEA-4 y/o nanog. Las células pueden ser alogénicas o xenogénicas para el sujeto. Las células pueden derivar de tejido placentario, tejido del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre, tejido del bazo, tejido del timo, tejido adiposo del tejido de la médula espinal o tejido hepático. Las células pueden derivar de la médula ósea humana. El sujeto puede ser un ser humano, un animal de granja, un animal de competición o un animal de compañía, por ejemplo, en el que dichas células son células de

- ser humano, caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo, rata o ratón. Las células pueden haber experimentado por lo menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo. Las células pueden haber experimentado por lo menos 40 duplicaciones celulares en cultivo. Las células se pueden administrar al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $10^4$  a  $10^8$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto. El sujeto también puede tratarse con un agente antibiótico, un agente antifúngico, un agente antivírico y/o un agente inmunosupresor, por ejemplo, el sujeto también puede tratarse con uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, ciclofosfamida, globulina antitumoral, azatioprina, rapamicina, FK-506, un agente inmunosupresor macrólido distinto de FK-506 y rapamicina. Las células pueden usarse en el tratamiento adyuvante de un trastorno mieloproliferativo, un trastorno linfoproliferativo o neoplasma. La inmunosupresión puede ser para HCl o EICH.
- Según un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), caracterizadas como células que no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales, en las que las células expresan telomerasa y expresan oct-3/4 y no posee una respuesta inmunitaria deletérea en la fabricación de un medicamento para la inmunosupresión en un sujeto, en el que las células se administran de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos.
- También se describen células que: (i) no son células madre embrionarias, no células germinales embrionarias, y no células germinales, (ii) pueden diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de por lo menos dos linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico, (iii) no provocan una respuesta inmunitaria perjudicial tras la introducción en un sujeto no singénico, y (iv) pueden modular una respuesta inmunitaria tras la introducción en un sujeto. También se describen células que, además de lo anteriormente expuesto, las células son inmunosupresoras.
- Además, diversos casos proporcionan células Según lo anteriormente expuesto que tienen propiedades inmunomoduladoras que resultan útiles para tratar, tal como impedir, evitar, mejorar, disminuir, reducir, minimizar, eliminar y/o curar respuestas y/o procedimientos inmunitarios perjudiciales en un huésped. En algunos casos las células son utilizadas a este respecto solas o junto con otros agentes y modalidades terapéuticas como modalidades terapéuticas primarias. En algunos casos las células son utilizadas en una modalidad terapéutica complementaria en la que pueden utilizarse como el único agente terapéutico o junto con otros agentes terapéuticos. En algunos casos las células son utilizadas, solas o con otros agentes o modalidades terapéuticas, tanto en una o mas modalidades terapéuticas primarias como en una o mas modalidades terapéuticas complementarias.
- Las células para uso de acuerdo con la invención son descritas en mayor detalle en la presente memoria y generalmente se denominan en la presente memoria "células progenitoras adultas multipotentes" y mediante el acrónimo "CPAM" (singular y plural) Debe apreciarse que estas células no son CME, no CMG, y no células germinales, y que presentan la capacidad de diferenciarse en tipos celulares de por lo menos dos de los tres linajes primitivos de la capa germinal (ectodermo, mesodermo y endodermo), p.ej., en células de la totalidad de los tres linajes primitivos.
- Por ejemplo, las CPAM pueden formar las células siguientes y otras células de los linajes de las mismas: células mesodérmicas esplénicas, células musculares, células óseas, células cartilaginosas, células endocrinas, células exocrinas, células endoteliales, células formadoras de pelo, células formadoras de diente, células mesodérmicas viscerales, células hematopoyéticas, células estromales, células estromales de la medula, células neuronales, células neuroectodérmicas, células epiteliales, células oculares, células pancreáticas y células de tipo hepatocito, entre muchas otras. Entre las células formadas por CPAM se encuentran osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células de musculo esquelético, miocitos esqueléticos, células epiteliales biliares, célula acinares pancreáticas, células mesangiales, células de musculo liso, células musculares cardíacas, cardiomiocitos, osteocitos, células formadoras de tubo vascular, oligodendrocitos, neuronas, incluyendo neuronas serotoninérgicas, GABA-érgicas y dopaminérgicas, células gliales, células microgliales, células epiteliales pancreáticas, células epiteliales intestinales, células epiteliales hepáticas, células epiteliales de la piel, células epiteliales de riñón, células epiteliales renales, células de islotes pancreáticos, fibroblastos, hepatocitos y otras células de los mismos linajes que los anteriores, entre muchos otros.
- Las CPAM presentan actividad de telomerasa necesaria para la autorrenovación y se cree que resultan necesarias para el mantenimiento de un estado no diferenciado. Generalmente también expresan oct-3/4. Oct-3/4 (oct-3A en el ser humano) de otra manera es específico de las células CME, CE y células germinales. Se considera que es un marcador de células no diferenciadas que presentan amplias capacidades de diferenciación. Además, se cree generalmente que Oct-3/4 presenta una función en el mantenimiento de la célula en un estado no diferenciado. Oct-4 (oct-3 en el ser humano) es un factor de transcripción expresado en el embrión pregastrulación, en el embrión en estadio temprano de división, células de masa celular interna del blastocisto y células de carcinoma embrionario ("CE") (Nichols J. et al., Cell 95: 379-91, 1998), y esta regulada negativamente al inducir la diferenciación de las células. El gen oct-4 (oct-3 en el ser humano) se transcribe en por lo menos dos variantes de procesamiento en el ser humano: oct-3A y oct-3B. La variante de procesamiento oct-3B se encuentra en muchas células diferenciadas, mientras que la variante de procesamiento oct-3A (también denominada previamente oct-3/4) se informa que es específica de la célula madre embrionaria no diferenciada. Véase Shimozaki et al., Development 130: 2505-12, 2003. La expresión de oct-3/4 desempeña una función importante en la determinación de las etapas tempranas en la embriogénesis y diferenciación. Oct-3/4, en combinación con rox-1, causa la activación transcripcional de la proteína de dedo de Zn, rex-1, que también resulta necesaria para el mantenimiento de las células CME en un estado no diferenciado (Rosfjord, E. y Rizzino, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1795-802, 1997; Ben-Shushan, E. et al., Mol. Cell Biol. 18: 1866-78, 1998).

Las CPAM generalmente también expresan otros marcadores que se cree que son específicos de las células madre primitivas. Entre ellas se encuentran rex1- rox-1 y sox-2. Rex-1 esta controlado por oct-3/4, que activa la expresión posterior de rex-1. Rox-1 y sox-2 se expresan en células no CME.

En la presente memoria se describen procedimientos para utilizar CPAM para evitar, prevenir, tratar, mejorar, disminuir, reducir, minimizar, eliminar y/o curar una enfermedad y/o una respuesta y/o procedimientos inmunitarios adversos en un sujeto. En la presente memoria se dan a conocer procedimientos para utilizar las células por sí solas como una modalidad terapéutica primaria. En algunos casos las células se utilizan junto con otro u otros agentes y/o modalidades terapéuticas como la modalidad terapéutica primaria. En algunos casos las células son utilizadas como una modalidad terapéutica complementaria, es decir, como un complemento a otra modalidad terapéutica primaria. En algunos casos, las células se utilizan como el único agente activo de una modalidad terapéutica complementaria. En otros, las células se utilizan como una modalidad terapéutica complementaria junto con otro u otros agentes o modalidades terapéuticas. En algunos casos las células son utilizadas como agentes y/o modalidades terapéuticas tanto primarias como complementarias. En ambos aspectos, las células pueden utilizarse solas en la modalidad primaria y/o en la modalidad complementaria. También pueden utilizarse junto con otros agentes o modalidades terapéuticas, en la modalidad primaria o en la modalidad complementaria, o en ambas.

Tal como se ha comentado anteriormente, un tratamiento primario, tal como un agente terapéutico, terapia y/o modalidad terapéutica presenta como diana (es decir, se pretende que actúe sobre) la disfunción primaria, tal como una enfermedad, que debe tratarse. Un tratamiento complementario, tal como una terapia y/o una modalidad terapéutica, puede administrarse en combinación con un tratamiento primario, tal como un agente terapéutico, terapia y/o modalidad terapéutica, para actuar sobre la disfunción primaria, tal como una enfermedad, y complementar el efecto del tratamiento primario, incrementando de esta manera la eficacia global del régimen de tratamiento. Un tratamiento complementario, tal como un agente, terapia y/o modalidad terapéutica, también puede administrarse para actuar sobre complicaciones y/o efectos secundarios de una disfunción primaria, tal como una enfermedad, y/o los causados por un tratamiento, tal como un agente terapéutico, terapia y/o modalidad terapéutica. Con respecto a cualquiera de dichos usos, puede utilizarse uno, dos, tres o mas tratamientos primarios junto con uno, dos, tres o mas tratamientos complementarios.

En algunos casos las CPAM son administradas en un sujeto antes la aparición de una disfunción, tal como una enfermedad, efecto secundario y/o respuesta inmunitaria perjudicial. En algunos casos las células son administradas mientras se esta desarrollando la disfunción. En algunos casos las células son administradas después de haberse establecido la disfunción. Las células pueden administrarse en cualquier estadio en el desarrollo, persistencia y/o propagación de la disfunción o después de que remita.

Tal como se ha comentado anteriormente, en la presente memoria se describen células y procedimientos para la terapia primaria o complementaria. En ciertos casos las células son administradas en un sujeto alogénico. En algunos casos son autólogas con respecto al sujeto. En algunos casos son singénicas con respecto al sujeto. En algunos casos las células son xenogénicas con respecto al sujeto. Sean alogénicas, autólogas, singénicas o xenogénicas, en diversos casos las CPAM son débilmente inmunogénicas o no son inmunogénicas en el sujeto. En algunos casos las CPAM presentan una inmunogenicidad suficientemente baja o son no inmunogénicas y se encuentran suficientemente libres de respuestas inmunitarias perjudiciales en general, que al administrarlas en sujetos alogénicos pueden utilizarse como células donantes "universales" sin tipado de tejidos y compatibilidad. Las CPAM también pueden almacenarse y mantenerse en bancos celulares y, de esta manera, pueden mantenerse disponibles para la utilización en caso necesario.

En la totalidad de dichos aspectos y en otros, en la presente memoria se describen las CPAM que proceden de mamíferos, incluyendo en un caso de seres humanos, y en otros casos de primates no humanos, ratas y ratones, y perros, cerdos, cabras, ovejas, caballos y vacas. Las CPAM preparadas a partir de mamíferos tal como se ha descrito anteriormente pueden utilizarse en la invención descrita en la presente memoria.

Las CPAM pueden aislarse a partir de una diversidad de compartimientos y tejidos de dichos mamíferos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, médula ósea, sangre, bazo, hígado, musculo, cerebro y otros comentados posteriormente. En algunos casos las CPAM son cultivadas antes de la utilización.

En algunos casos las CPAM son manipuladas genéticamente, tal como para mejorar sus propiedades inmunomoduladoras. En algunos casos las CPAM manipuladas genéticamente son producidas mediante cultivo *in vitro*. En algunos casos las CPAM manipuladas genéticamente son producidas a partir de un organismo transgénico.

En diversos casos las CPAM son administradas en el sujeto mediante cualquier vía para la administración eficaz de terapéuticos celulares. En algunos casos las células son administradas mediante inyección, incluyendo la inyección local y/o sistémica. En algunos casos las células son administradas en el sitio y/o en proximidad al sitio de la disfunción que pretenden tratar. En algunos casos las células son administradas mediante inyección en una localización no en proximidad al sitio de la disfunción. En algunos casos las células son administradas mediante inyección sistémica, tal como la inyección intravenosa.

En algunos casos las CPAM son administradas una vez, dos veces, tres veces, o mas de tres veces, hasta que se

consigue un efecto terapéutico deseado o la administración aparentemente ya no es probable que proporcione un beneficio para el sujeto. En algunos casos las CPAM son administradas continuamente durante un periodo de tiempo, tal como mediante goteo intravenoso. La administración de CPAM pueden realizarse durante un periodo de tiempo corto, durante días, durante semanas, durante meses, durante años o durante periodos de tiempo mas prolongados.

5 Los siguientes párrafos describen algunos ejemplos ilustrativos de la divulgación.

También se describe en el presente documento un procedimiento para tratar una disfunción inmunológica en un sujeto, que comprende: administrar a un sujeto que probablemente sufre, sufra o haya padecido una disfunción inmunológica, por una vía eficaz y en una cantidad eficaz para tratar la disfunción inmunológica, células (CPAM) que: no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales; puede diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de por lo menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos; no provocan una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto; y son eficaces para tratar la disfunción inmunológica.

10

También se describe en el presente documento un procedimiento de tratamiento complementario de un sujeto, que comprende: administrar a un sujeto que probablemente sufre, sufra o haya padecido una disfunción inmunológica, por una vía eficaz y en una cantidad eficaz para tratar la disfunción inmunitaria, células (CPAM) que: no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales; puede diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de por lo menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos; no provocan una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto; y son eficaces para tratar la disfunción inmunitaria, en la que las células se administran de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos administrados al sujeto para tratar lo mismo, para tratar algo diferente o ambos.

15

20 Dichas células pueden diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos. Dichas células pueden expresar telomerasa.

Dichas células pueden ser positivas para oct-3/4. Dichas células pueden haber experimentado por lo menos de 10 a 40 duplicaciones de células en cultivo antes de su administración al sujeto. Dichas células pueden ser células de mamífero. Dichas células pueden ser células humanas, de caballo, de vaca, de cabra, de oveja, de cerdo, de rata o de ratón. Dichas células pueden ser células humanas, de rata o de ratón. Dichas células pueden ser células humanas. Dichas células pueden derivar de células aisladas de cualquier tejido placentario, tejido del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre, tejido del bazo, tejido del timo, tejido de la médula espinal, tejido adiposo y tejido del hígado. Dichas células pueden derivar de células aisladas de cualquier tejido placentario, tejido del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre y tejido del bazo. Dichas células pueden derivar de células aisladas de cualquier tejido placentario, tejido del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, médula ósea o sangre. Dichas células pueden derivar de células aisladas de una o más de médula ósea o sangre. Dichas células pueden ser alogénicas para el sujeto. Dichas células pueden ser xenogénicas para el sujeto. Dichas células pueden ser autólogas para el sujeto.

25

30

El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un animal de compañía mamífero, un animal de ganado mamífero, un animal de investigación mamífero o un primate no humano.

35

El sujeto puede ser un ser humano.

Dichas células se pueden administrar al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $10^4$  a  $10^8$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto. Dichas células se pueden administrar al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $10^5$  a  $10^7$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto. Dichas células se pueden administrar al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $5 \times 10^6$  a  $5 \times 10^7$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto. Dichas células se pueden administrar al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $2 \times 10^7$  a  $4 \times 10^7$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto.

40

Además de dichas células, se pueden administrar uno o más factores a dicho sujeto. Además de dichas células, se pueden administrar a dicho sujeto uno o más factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores de señalización y/o factores que aumentan el reconocimiento. Además de dichas células, se pueden administrar una o más citoquinas a dicho sujeto.

45

Dichas células se pueden administrar a un sujeto de forma complementaria a otro tratamiento que se administra antes, al mismo tiempo o después de la administración de dichas células. Dichas células se pueden administrar al sujeto de forma complementaria a la administración al sujeto de uno o más agentes inmunosupresores. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante, en el que dichas células se administran de forma complementaria al mismo. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante de riñón, corazón, pulmón, hígado u otro órgano, en el que dichas células se administran de forma complementaria. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante de médula ósea, vena, arteria, músculo u otro tejido, en el que dichas células se administran de forma complementaria a las mismas. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante de células sanguíneas, células de los islotes u otras células en regeneración de tejidos u órganos, en el que dichas células se administran de forma complementaria a las mismas. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante de células sanguíneas, en el que dichas

50

55



células se administran de forma complementaria al mismo. Además del tratamiento con dichas células, el sujeto puede recibir o puede haber recibido un trasplante de médula ósea, en el que dichas células se administran de forma complementaria al mismo. Además del tratamiento con dichas células, en algunos casos el sujeto ha sido, será o será tratado con uno o más agentes inmunosupresores, en el que dichas células se administran de forma complementaria a los mismos. Además del tratamiento con dichas células, en algunos casos el sujeto ha sido, será o está siendo tratado con uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, un agente inmunosupresor similar a ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitumoral, azatioprina, rapamicina, FK-506, y un agente inmunosupresor de tipo macrólido diferente de FK-506, rapamicina y un agente de anticuerpo monoclonal inmunosupresor (es decir, un inmunosupresor que es un anticuerpo monoclonal inmunosupresor o es un agente que comprende un anticuerpo monoclonal, en su totalidad o en uno o más partes, tales como una proteína quimérica que comprende un Fc o un sitio de unión a Ag de un anticuerpo monoclonal), en el que dichas células se administran de forma complementaria a las mismas. Además del tratamiento con dichas células, en algunos casos el sujeto ha sido, será o está siendo tratado con uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, rapamicina, ciclofosfamida, FK-506 o un agente de anticuerpo monoclonal inmunosupresor, en el que dichas células se administran de forma complementaria a los mismos.

Dichas células se pueden administrar al sujeto de forma complementaria a la administración al sujeto de uno o más agentes antibióticos. Dichas células se pueden administrar al sujeto de forma complementaria a la administración al sujeto de uno o más agentes antifúngicos.

Dichas células pueden administrarse al sujeto de forma complementaria a la administración al sujeto de uno o más agentes antivirales. Dichas células se pueden administrar al sujeto de forma complementaria a la administración al sujeto de cualquier combinación de dos o más de cualesquiera agentes inmunosupresores y/o agentes antibióticos y/o agentes antifúngicos y/o agentes antivirales. Dichas células pueden administrarse al sujeto de forma complementaria a una terapia de trasplante para tratar una respuesta del huésped frente al injerto en el sujeto que está alterando o podría alterar la eficacia terapéutica del trasplante y/o es o podría resultar en el rechazo del trasplante. Dichas células se pueden administrar a un sujeto que tiene un sistema inmunológico debilitado, tal como uno o más de un sistema inmunológico comprometido y/o un sistema inmunológico ablacionado. Dichas células pueden administrarse a un sujeto de forma complementaria a la radioterapia o quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapia que se han administrado, se están administrando o se administrarán al sujeto. Dichas células pueden administrarse a un sujeto de forma complementaria a un régimen continuo de radioterapia o quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapia.

El sistema inmunológico del sujeto puede haberse debilitado, comprometido y/o anulado por radioterapia, quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapia. En algunos casos, el sujeto es el receptor de un trasplante de médula ósea o de células sanguíneas no singénicas, el sistema inmunológico del sujeto se ha debilitado o se ha anulado por radioterapia, quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapia, y el sujeto está en riesgo de desarrollar o ha desarrollado la enfermedad de injerto contra huésped. En algunos casos, el sujeto es el receptor de un trasplante de células sanguíneas o de médula ósea no singénicas, el sistema inmunológico del sujeto se ha debilitado o se ha anulado mediante radioterapia, quimioterapia o una combinación de radioterapia y quimioterapia, y se están administrando fármacos inmunosupresores al sujeto, en los que además el sujeto está en riesgo de desarrollar o ha desarrollado una enfermedad de injerto contra huésped y dichas células se administran a dicho sujeto para tratar la enfermedad de injerto contra huésped de forma complementaria a uno o más de los otros tratamientos (que es: el trasplante, la radioterapia, la quimioterapia y/o los fármacos inmunosupresores). En algunos casos, el sujeto será o es el receptor de un trasplante no singénico y está en riesgo o ha desarrollado una respuesta de huésped contra injerto, en el que dichas células se administran para tratar la respuesta de huésped contra injerto. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer una neoplasia y dichas células se administran de forma complementaria a un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una neoplasia de células sanguíneas o de la médula ósea y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una neoplasia benigna de células de la médula ósea, un trastorno mieloproliferativo, un síndrome mielodisplásico o una leucemia aguda y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer una neoplasia benigna de células de la médula ósea o la padece y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas.

En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece un trastorno mieloproliferativo y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas.

En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una o más leucemia mielocítica crónica ("LMC") (también llamada leucemia granulocítica crónica ("LGC")), mielofibrosis agnógena, trombocitemia esencial, policitemia vera u otros trastornos mieloproliferativos y dichas células se administran como complemento de un tratamiento del mismo. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece un síndrome mielodisplásico y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer leucemia aguda o la padece y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece uno o más de mieloma múltiple agudo, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica crónica ("LMC"), leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda pre-B, leucemia linfocítica crónica ("LLC"), linfoma de células B, leucemia de células pilosas,

mieloma, leucemia linfoblástica aguda T, linfoma de células T periféricas, otras leucemias linfoides, otros linfomas u otras leucemias agudas y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer anemia u otro trastorno sanguíneo o padece de ella y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer hemoglobinopatías, talasemia, síndrome de insuficiencia de la médula ósea, anemia de células falciformes, anemia aplásica, anemia de Fanconi o una anemia hemolítica inmune y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una o más de anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, leucemia mielomonocítica crónica u otro síndrome mielodisplásico y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece anemia de Fanconi y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer una disfunción inmunológica o la padece y dichas células se administran de forma complementaria a un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece inmunodeficiencia congénita y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una disfunción, trastorno o enfermedad autoinmunitaria y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una o más de las siguientes disfunciones autoinmunitarias: enfermedad de Crohn, síndrome de Guillain-Barré, lupus eritematoso (también llamado "LES" y lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuritis óptica, psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis de Ord, diabetes mellitus (tipo 1), síndrome de Reiter, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos ("APS"), síndrome opsoclono-mioclono ("SOM"), arteritis temporal, encefalomiелitis diseminada aguda ("EMAD" y "EAD"), síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, pénfigo, poliartritis y anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una o más de las siguientes disfunciones autoinmunitarias: enfermedad de Crohn, lupus eritematoso (también llamado "LES" y lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, artritis reumatoide, Enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, diabetes mellitus (tipo 1), síndrome de Reiter, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, poliartritis y anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer o padece una o más de las siguientes enfermedades que se cree que tienen un componente autoinmunitario: endometriosis, cistitis intersticial, neuromiotonía, esclerodermia, esclerodermia sistémica progresiva, vitiligo, vulvodinia, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, síndrome de fatiga crónica y disautonomía y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas. En algunos casos, el sujeto está en riesgo de padecer una enfermedad inflamatoria o la padece y dichas células se administran como complemento de un tratamiento de las mismas.

Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos. Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más de otros agentes inmunosupresores. Dichas células pueden administrarse en una formulación que comprende uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, un agente inmunosupresor similar a ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitumocítica, azatioprina, rapamicina, FK-506 y un agente inmunosupresor similar a macrólico distinto de FK- 506, rapamicina y un agente de anticuerpo monoclonal inmunosupresor. Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, azatioprina, ciclofosfamida, rapamicina, FK-506 y un agente de anticuerpo monoclonal inmunosupresor. Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más agentes antibióticos. Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más agentes antifúngicos. Dichas células se pueden administrar en una formulación que comprende uno o más agentes antivirales. Dichas células se pueden administrar al sujeto por vía parenteral. Dichas células pueden administrarse al sujeto mediante una cualquiera o más de las siguientes vías parenterales: inyección intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal, intratecal, intraósea, intraarticular, intrasínovial, intracutánea, intradérmica, subcutánea e intramuscular. Dichas células pueden administrarse mediante una o más de las siguientes vías parenterales: inyección intravenosa, intraarterial, intracutánea, subcutánea e intramuscular. Dichas células se pueden administrar al sujeto a través de una aguja hipodérmica mediante una jeringa. Dichas células se pueden administrar al sujeto a través de un catéter. Dichas células pueden administrarse mediante implantación quirúrgica. Dichas células se pueden administrar al sujeto mediante implantación usando un procedimiento artroscópico. Dichas células se pueden administrar al sujeto en o sobre un soporte. Dichas células se pueden administrar al sujeto en forma encapsulada.

Dichas células se pueden formular de forma adecuada para su administración mediante una o más de las siguientes vías: oral, rectal, epicutánea, ocular, nasal y pulmonar. Dichas células se pueden administrar al sujeto en una dosis. Dichas células se pueden administrar al sujeto en una serie de dos o más dosis sucesivas. Dichas células pueden administrarse en una sola dosis, en dos dosis o en más de dos dosis, siendo las dosis iguales o diferentes, y se administran con intervalos iguales o desiguales entre ellas. Dichas células se pueden administrar durante un período de menos de un día a una semana, de una semana a un mes, de un mes a un año, de un año a dos años o más de dos años.

También se describe en el presente documento un procedimiento de tratamiento de una disfunción inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que padece una disfunción inmune, por una vía y en una cantidad eficaz para tratar la disfunción inmune en el sujeto, células que: no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales; puede diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de por lo menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos; no provoca una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto; y son eficaces para tratar la disfunción inmunológica del sujeto.

También se describe en el presente documento un procedimiento de tratamiento complementario de una disfunción inmune en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que padece una disfunción inmune, por una vía y en una cantidad eficaz para tratar la disfunción inmune en el sujeto, células que: no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales; puede diferenciarse en por lo menos un tipo celular de cada uno de por lo menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos; no provoca una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto; y son eficaces para tratar la disfunción inmunológica en el sujeto, en el que las células se administran al sujeto de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos que se administran al sujeto para tratar la misma disfunción inmunitaria, para tratar una o más disfunciones distintas, o ambas.

### Breves descripciones de las figuras

La figura 1 es una representación esquemática de los estudios de perfilado transcripcional que se han llevado a cabo para generar (identificar) marcadores génicos y basados en receptores de superficie que distinguen entre los CPAM de la invención y otras células madre y progenitoras que presentan mayor compromiso de linaje. Los experimentos resultaron en un panel de 75 marcadores con una expresión con diferencias de expresión de factor 10 entre los cultivos de CMM y las CPAM.

La figura 2 es un grupo de gráficos que muestra la diferenciación tri-linaje de CPAM de rata marcadas con GFP. Los resultados muestran que las CPAM pueden diferenciarse en células de la totalidad de los tres linajes embrionarios. Tal como se indica adicionalmente después, para la diferenciación endotelial, se cultivaron las CPAM sobre placas recubiertas con fibronectina en presencia de factor B de crecimiento endotelial vascular (VEGF-B, por sus siglas en ingles). Para la diferenciación de hepatocitos, las células se cultivaron sobre placas recubiertas con Matrigel y se trataron con factor-4 de crecimiento fibroblástico (FGF-4, por sus siglas en ingles) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Se indujo la diferenciación neuronal mediante el tratamiento secuencial con FGF básico (bFGF), tanto con FGF-8 como Sonic Hedgehog (SHH), y con factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Tras dos semanas, se extrajo ARNm a partir de las células y se aplicó al análisis de qPCR utilizando cebadores específicos para la detección de diversos marcadores de linaje. En la totalidad de los ensayos, como controles se utilizaron células cultivadas en ausencia de citoquinas inductoras de linaje. En primer lugar, los niveles de expresión de marcadores de linaje se normalizaron respecto al nivel de expresión de un gen de control interno (GAPDH), que no resulta afectado durante la diferenciación. A continuación, se evaluó el éxito de la diferenciación mediante el cálculo de la expresión relativa en las células diferenciadas o de control en comparación con los niveles en la línea de rata parental, utilizando un incremento de más de 5 veces de la expresión relativa como valor de corte para la diferenciación con éxito. Las CPAM de rata diferenciadas mostraron una expresión significativa de los marcadores endoteliales, factor de von Willebrand y PECAM-1 (panel superior); los marcadores hepáticos albumina, citoqueratina-18 y HNF-1a (panel intermedio) y los marcadores neuronales/astrocíticos GFAP, nestina y NF-200 (panel inferior).

La figura 3 es una pareja de gráficos de columnas que muestran la baja inmunogenicidad (panel superior) e inmunosupresividad (panel inferior) de CPAM en reacciones de linfocitos mixtos (RLM), tal como se indica adicionalmente después. En el panel superior: B + B = donante B + donante B; B + A = donante B + donante A; B + K = donante B + donante K; B + R = donante B + donante R; B + T = donante B + donante T; donante B + PHA; B + BMPC = donante B + CPAM. Se consiguieron los mismos resultados con doce donantes diferentes. En el panel inferior: donante W + donante W; donante W + donante A; donante W + donante T; donante W + CMM; donante W + CPAM (17); donante W + PHA; donante W + donante A + MSC; donante W + donante A + CPAM (17); donante W + donante T + CMM; donante W + donante T + CPAM (17); donante W + donante P + CMM; donante W + donante P + CPAM (17). PHA es fitohemaglutinina (control positivo de activación de las células T).

La figura 4 es un gráfico que muestra que las CPAM pueden suprimir la proliferación de las células T estimuladas por ConA, tal como se indica en el Ejemplo 6. El pie "solo LN" indica los resultados para reacciones de control que omiten las CPAM. Los números para las CPAM indican cuantas células se utilizaron en los ensayos.

La figura 5A es un gráfico que muestra los efectos inmunosupresores de las CPAM de Lewis en reacciones de linfocitos mixtos, tal como se indica en el Ejemplo 7. La caja en la figura 5A proporciona el número de CPAM en cada reacción. En la caja, R designa las células respondedoras y S designa las células estimuladoras (esplenocitos irradiados de ratas DA).

La figura 5B es un gráfico que muestra los efectos inmunosupresores de las CPAM de Sprague-Dawley en reacciones de linfocitos mixtos, tal como se indica en el Ejemplo 7. Los pies y abreviaturas son los mismos que en la figura 5A.

La figura 6 es un gráfico que muestra que la infusión de CPAM no afecta adversamente a la salud de los receptores. Según se determina a partir de su tasa respiratoria. El gráfico se describe adicionalmente en el Ejemplo 8.

La figura 7 es un grafico de columnas que ilustra los resultados de un experimento que demuestra la capacidad de las CPAM de suprimir una respuesta inmunitaria continua. El grafico muestra que las CPAM son fuertemente inmunosupresoras en RLM, tanto cuando se añaden simultáneamente como el activador de células T (estimulador) (día 0, lado izquierdo del grafico), como cuando se añaden 3 días después de la adición del activador de células T (estimulador) (día 3, lado derecho del grafico). Se describen adicionalmente detalles de los experimentos en el Ejemplo 10.

La figura 8 es un grafico de columnas que muestra que la inhibición de CPAM de la proliferación de las células T en RLM es reversible. Los resultados se expresan como cpm medias +/- SD de cultivos por triplicado. El grafico se describe adicionalmente en el Ejemplo 11.

La figura 9 es un grafico que muestra que las CPAM inhiben la EICH, tal como se indica en el Ejemplo 13.

#### Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, determinados términos presentan los significados explicados posteriormente.

“Un” o “una” significa uno o mas; por lo menos uno.

“Complementario” significa conjunto, junto con, además de, conjuntamente con, y similares.

“Coadministrar” puede incluir la administración simultanea o secuencial de dos o mas agentes.

“Citoquinas” se refiere a factores celulares que inducen o potencian el movimiento celular, tal como el reconocimiento de las CPAM u otras células madre u otras células madre, células progenitoras o células diferenciadas. Las citoquinas pueden estimular además la división de dichas células.

“Perjudicial” se refiere, tal como se utiliza en la presente memoria, dañino. A título ilustrativo, “respuesta inmunitaria perjudicial” se refiere, tal como se utiliza en la presente memoria, a una respuesta inmunitaria perjudicial, tal como las ausentes o las excesivamente débiles, aquellas que son excesivamente fuertes y/o aquellas que están incorrectamente dirigidas. Entre las respuestas inmunitarias perjudiciales se encuentran las respuestas inmunitarias dañinas que se producen en las enfermedades inmunitarias. Entre los ejemplos se incluyen la falta de respuestas inmunitarias en las enfermedades de inmunodeficiencia, y las respuestas inmunitarias exageradas y/o dirigidas incorrectamente en enfermedades autoinmunitarias. También entre las respuestas inmunitarias perjudiciales se encuentran respuestas inmunitarias que interfieren con el tratamiento medico, incluyendo respuestas inmunitarias de otro modo normales. Entre los ejemplos se incluyen respuestas inmunitarias implicadas en el rechazo de trasplantes e injertos, y la respuesta de células inmunocompetentes en trasplantes e injertos que causan enfermedad del injerto contra el huésped.

Los “factores de diferenciación” se refieren a factores celulares, tales como factores de crecimiento, que incluyen el compromiso de linaje.

“Disfunción” significa, tal como se utiliza en la presente memoria, un trastorno, enfermedad o efecto perjudicial de un proceso de otro modo normal. A título ilustrativo, una disfunción inmunitaria incluye enfermedades inmunitarias, tales como enfermedades autoinmunitarias y deficiencias inmunitarias. Incluye además respuestas inmunitarias que interfieren con el tratamiento medico, incluyendo respuestas inmunitarias de otro modo normales que interfieren con el tratamiento medico. Entre los ejemplos de dichas disfunciones se incluyen respuestas inmunitarias implicadas en el rechazo de trasplantes e injertos, y la respuesta de células inmunocompetentes en trasplantes e injertos que causan enfermedad del injerto contra el huésped.

“Células CE” se refiere a células de carcinoma embrionario.

“Cantidad eficaz” se refiere de manera general a una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. Las cantidades eficaces pueden proporcionarse de una vez en una única administración o en cantidades fraccionadas que proporcionan la cantidad eficaz en varias administraciones. Por ejemplo, una cantidad eficaz de CPAM podría administrarse en una o mas administraciones y podría incluir cualquier cantidad preseleccionada de células. La determinación precisa de lo que se consideraría una cantidad eficaz puede basarse en factores individuales de cada sujeto, incluyendo su tamaño, edad, lesión y/o enfermedad o lesión bajo tratamiento, y la cantidad de tiempo desde que se ha producido la lesión o se ha iniciado la enfermedad. El experto en la materia será capaz de determinar la cantidad eficaz para un sujeto dado basándose en dichas consideraciones, las cuales son rutinarias de la técnica. De esta manera, por ejemplo, el experto en la materia, tal como un medico, basándose en las propiedades conocidas de las CPAM tal como se dan a conocer en la presente memoria y en la técnica, junto con una consideración de los factores anteriormente indicados, podrá determinar la cantidad eficaz de CPAM para un sujeto dado. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “dosis eficaz” se refiere a lo mismo que “cantidad eficaz”.

“Células GE” se refiere a células germinales embrionarias.

"Injertación" se refiere al procedimiento de contacto celular e incorporación en un tejido existente de interés *in vivo*.  
 "Población enriquecida" se refiere a un incremento relativo del número de CPAM respecto a otras células o constituyentes en una población inicial, tal como un incremento del número de CPAM respecto a uno o mas tipos celulares no CPAM, tal como un cultivo primario, o *in vivo*.

5 "Células ME" se refiere a células madre embrionarias.

"Expansión" se refiere a la propagación de una célula o células sin diferenciación.

"Anemia de Fanconi" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a lo mismo que anemia Fanconi, una enfermedad hereditaria.

10 "EICH" se refiere a la enfermedad del injerto contra el huésped, que se refiere a procesos que se producen principalmente en un huésped inmunocomprometido al resultar reconocido como no propio por células inmunocompetentes de un injerto.

"HCI" se refiere a una respuesta de huésped contra el injerto, que se refiere a procesos que se producen al rechazar un huésped un injerto. Típicamente, la HCI resulta inducida cuando un injerto es reconocido como foráneo (no propio) por células inmunocompetentes del huésped.

15 "Aislado" se refiere a una célula o células que no están asociadas a una o mas células o uno o mas componentes celulares que están asociados a la célula o células *in vivo*.

20 "CPAM" es un acrónimo de "célula progenitora adulta multipotente". Se refiere a una célula no ME, no GE, que puede dar lugar a linajes celulares de mas de una capa germinal, tal como la totalidad de las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo). Las CPAM también presentan actividad de telomerasa. Pueden ser positivas para oct-3/4 (p.ej., oct-3A humana). También pueden expresar rex-1 y rox-1. Además, pueden expresar sox-2, SSEA-4 y/o nanog. El termino "adulto" en las CPAM no es restrictivo. Solo denota que dichas células no son células ME, GE o germinales. Típicamente, tal como se utiliza en la presente memoria, CPAM es singular o plural. Las CPAM también pueden denominarse células madre adultas multipotentes (CMAM). Ver la patente US n° 7.015.037.

"CMAM", ver CMAP.

25 "CMN" se refiere a células mononucleares.

"Modalidad" se refiere a un tipo, enfoque, camino o procedimiento, tal como, una modalidad terapéutica, es decir, un tipo de terapia.

"CMM" es un acrónimo de células madre mesenquimales.

30 "Multipotente" con respecto a las CPAM, se refiere a la capacidad de dar lugar a linajes celulares de mas de una capa germinal, tal como la totalidad de las tres capas germinales primitivas (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) con la diferenciación.

"Persistencia" se refiere a la capacidad de las células de resistir el rechazo y mantenerse y/o incrementarse en numero con el tiempo (p.ej., días, semanas, meses o años) *in vivo*.

35 "Progenitor" tal como se utiliza en las células progenitoras adultas multipotentes (CPAM) indica que estas células pueden dar lugar a otras células, tales como células diferenciadas adicionales. El termino no es limitativo y no limita dichas células a un linaje particular.

"Autorrenovación" se refiere a la capacidad de producir células madre hijas de replica con potencial de diferenciación que es idéntico a aquellas de las que surgen. Un termino similar utilizado en el presente contexto es "proliferación".

40 Un "sujeto" es un vertebrado, tal como un mamífero, tal como un ser humano. Entre los mamíferos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, seres humanos, animales de granja, animales de competición, y animales de compañía. Entre los sujetos que requieren tratamiento mediante procedimientos de la presente divulgación se incluyen los que sufren de un trastorno, disfunción o enfermedad (tal como una deficiencia o disfunción inmunitaria, tal como HIC y EICH), o un efecto secundario del mismo, o un tratamiento del mismo, que pueden beneficiarse de la administración de CPAM como tratamiento primario o complementario.

45 "Trasplante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a introducir en un sujeto, células, tejidos u órganos. El trasplante puede derivarse del sujeto, de un cultivo o de una fuente no sujeto.

50 "Tratar", "tratando" o "tratamiento" incluyen tratar, prevenir, mejorar, inhibir o curar una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso que resulta de un efecto perjudicial, tal como una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso del sistema inmunitario que afecta perjudicialmente a las funciones o propiedades del sistema inmunitario o que interfiere con una terapia.

## Descripción detallada de la invención

### Introducción

Las CPAM resultan muy prometedoras para el tratamiento de enfermedades mediante técnicas de trasplante celular, tal como para la regeneración de tejidos y órganos, tanto utilizadas solas como utilizadas en combinación con otros tratamientos. Entre los potenciales obstáculos para convertir en realidad la promesa de las CPAM para el tratamiento de enfermedades, y para la regeneración de tejidos y órganos, se encuentran las reacciones inmunitarias adversas que típicamente complican o impiden el éxito de las terapias de trasplante, tales como las terapias de trasplante sanguíneo y de medula ósea y el trasplante de órganos sólidos. Destacan entre dichas complicaciones inmunitarias, el rechazo del injerto por el sistema inmunitario de un huésped (denominado en la presente memoria respuesta de huésped contra injerto y como "HIC") y el daño sistémico a un huésped inmunocomprometido que resulta cuando las células inmunocompetentes en un injerto resultan activadas por el contacto con componentes no propios del huésped (denominados en la presente memoria enfermedad del injerto contra el huésped y como "EICH").

Se ha encontrado (tal como se indica en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria) que las CPAM no provocan una respuesta inmunitaria en huéspedes alogénicos. De esta manera, el trasplante de CPAM en un huésped alogénico no debería producir un rechazo del injerto alogénico (es decir, HIC).

Además, también se ha encontrado que las CPAM alogénicas pueden administrarse en un huésped a concentración elevada sin producir efectos perjudiciales sobre la respiración, sugiriendo que no se produce una agregación y/o deposición indebidos en los pulmones.

Además, se ha encontrado (tal como se indica en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria) que las CPAM pueden modular respuestas inmunitarias. En particular a este respecto, se ha encontrado que las CPAM pueden suprimir respuestas inmunitarias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, respuestas inmunitarias implicadas en, por ejemplo, HIC y EICH, entre otras. En un detalle particular todavía mas detallado en este aspecto, se ha encontrado que las CPAM pueden suprimir la proliferación de las células T, incluso en presencia de potentes estimuladores de células T, tales como la concanavalina A y las células estimuladoras alogénicas.

Además, se ha encontrado que incluso cantidades relativamente pequeñas de CPAM pueden suprimir dichas respuestas. En efecto, solo 3 % de CPAM en reacciones de linfocitos mixtos resulta suficiente para reducir las respuestas de células T a potentes estimuladores en 50 % *in vitro*.

De acuerdo con lo anterior, también se describe en la presente memoria composiciones y procedimientos y similares para tratar, mejorar y/o curar o eliminar reacciones inmunitarias adversas, tales como las que se producen en terapias de trasplante.

La baja inmunogenicidad de las CPAM alogénicas, su capacidad de suprimir respuestas inmunitarias adversas y su elevada actividad específica las convierte en particularmente valiosas para terapias complementarias en el tratamiento de enfermedades con un componente inmunitario adverso. Entre dichas enfermedades se encuentran enfermedades autoinmunitarias en las que, típicamente, la disfunción del propio sistema inmunitario del sujeto causa enfermedad. Las CPAM también resultan útiles como terapéuticos complementarios inmunosupresores para el tratamiento de respuestas inmunitarias adversas que se producen en la terapia de trasplante. Entre los ejemplos se incluyen HIC en huéspedes inmunocompetentes y EICH en huéspedes inmunocomprometidos. Las CPAM además pueden resultar útiles en terapia inmunosupresora complementaria en el tratamiento de una diversidad de neoplasmas, anemias y trastornos sanguíneos, y en el tratamiento de determinadas enfermedades inflamatorias. Las enfermedades a este respecto se comentan en mayor detalle posteriormente.

Utilizando los procedimientos indicados en la presente memoria para el aislamiento, caracterización y expansión de las CPAM, junto con la exposición en la presente memoria sobre las propiedades inmunosupresoras de las CPAM, las CPAM pueden utilizarse para evitar, suprimir o disminuir los trastornos, disfunciones o enfermedades inmunitarias, incluyendo, por ejemplo, reacciones inmunitarias adversas, tales como las que resultan de otras terapias, incluyendo las que complican las terapias de trasplante, tales como HIC y EICH. Dichos trastornos, disfunciones y enfermedades incluyen además trastornos inmunitarios congénitos y enfermedades autoinmunitarias, entre otras.

Las CPAM resultan útiles a este respecto y en otros, tanto como agentes y modalidades primarios como complementarios. Las CPAM pueden utilizarse terapéuticamente juntas o junto con otros agentes. Las CPAM pueden administrarse antes, durante y/o después de dichos agentes. De manera similar, se utilicen solos o con otros agentes, las CPAM pueden administrarse antes, durante y/o después de un trasplante. En el caso de que se administren durante el trasplante, las CPAM pueden administrarse junto con el material de trasplante o por separado. En el caso de que se administren por separado, las CPAM pueden administrarse secuencial o simultáneamente con el trasplante. Además, las CPAM pueden administrarse antes del trasplante y/o después del trasplante.

Otros agentes que pueden utilizarse junto con las CPAM, en terapias de trasplante en particular, incluyendo agentes inmunomoduladores. En otros sitios de la presente memoria se describe una diversidad de dichos agentes. En ciertos casos, los agentes inmunomoduladores son agentes inmunosupresores, tales como los descritos en otros sitios de la presente memoria. Entre dichos agentes se encuentran corticoesteroides, ciclosporina A, compuestos

inmunosupresores de tipo ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato.

Las CPAM pueden administrarse en los huéspedes mediante una diversidad de procedimientos, tal como se comenta en otros sitios en la presente memoria. En ciertos casos las CPAM son administradas mediante inyección, tal como mediante inyección intravenosa. En ciertos casos las CPAM son encapsuladas para la administración. En ciertos casos las CPAM son administradas in situ. Entre los ejemplos se incluyen la administración de CPAM en el trasplante de órganos sólidos y en la reparación de órganos. Estas y otras formas de administración se comentan posteriormente.

En ciertos casos las CPAM son administradas en dosis medidas mediante la proporción de CPAM (células) a masa corporal (peso). Alternativamente, las CPAM pueden administrarse en dosis de un número fijo de células. Las dosis, las vías de administración, las formulaciones y similares se comentan en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria.

#### Mecanismos de acción

Sin limitarse a uno o mas cualesquiera mecanismos explicativos para las propiedades, actividades y efectos inmunomoduladores y otros de las CPAM, cabe destacarse que pueden modular las respuestas inmunitarias mediante una diversidad de modalidades. Por ejemplo, las CPAM pueden presentar efectos directos sobre un injerto o huésped. Dichos efectos directos son principalmente una cuestión de contacto directo entre las CPAM y las células del huésped o injerto. El contacto puede realizarse con elementos estructurales de las células o con constituyentes en su medio inmediato. Dichos mecanismos directos pueden implicar el contacto directo, la difusión, la incorporación u otros procesos bien conocidos por el experto en la materia. Las actividades y efectos directos de las CPAM pueden encontrarse limitados espacialmente, tal como a una zona de deposición local o a un compartimiento corporal al que se accede mediante inyección.

Las CPAM también pueden “localizarse” en respuesta a señales de “localización”, tales como las liberadas en sitios de lesión o enfermedad. Debido a que la localización con frecuencia se encuentra mediada por señales cuya función natural es atraer células a los sitios en que se requiere una reparación, el comportamiento de localización puede ser una herramienta potente para concentrar las CPAM en las dianas terapéuticas. Dicho efecto puede resultar estimulado por factores específicos, tal como se comenta posteriormente.

Las CPAM también pueden modular procesos inmunitarios por su respuesta a factores. Lo anterior puede producirse adicional o alternativamente a la modulación directa. Entre dichos factores pueden incluirse factores de localización, mitógenos y otros factores estimuladores. Pueden incluir además factores de diferenciación y factores que inducen procesos celulares particulares. Entre los últimos se encuentran factores que causan la secreción por células de otros factores específicos, tales como los que participan en atraer células, tales como células madre (incluyendo CPAM) a un sitio de lesión o enfermedad.

Las CPAM pueden, además de lo anterior, o alternativamente a lo anterior, secretar factores que actúan sobre células endógenas, tales como células madre o células progenitoras. Los factores pueden actuar sobre tras células para generar, potenciar, reducir o suprimir sus actividades. Las CPAM pueden secretar factores que actúan sobre células madre, progenitoras o diferenciadas, causando que dichas células se dividan y/o se diferencien. Las CPAM que se localizan en un sitio en donde se requiere reparación pueden secretar factores tróficos que atraen otras células al sitio. De esta manera, las CPAM pueden atraer células madre, progenitoras o diferenciadas a un sitio en donde resultan necesarias. Las CPAM pueden secretar además factores que causan la división o diferenciación de dichas células.

La secreción de dichos factores, incluyendo los factores tróficos, puede contribuir a la eficacia de las CPAM en, por ejemplo, la limitación del daño inflamatorio, limitando la permeabilidad vascular, mejorando la supervivencia celular y generando y/o potenciando la localización de las células de reparación en sitios de lesión. Dichos factores pueden afectar además a la proliferación de las células T directamente. Dichos factores pueden afectar además a las células dendríticas, mediante la reducción de sus actividades fagocíticas y de presentación de antígenos, que también pueden afectar a la actividad de las células T.

Mediante estos mecanismos y otros mecanismos, las CPAM pueden proporcionar efectos inmunomoduladores beneficiosos, incluyendo, aunque sin limitación, la supresión de reacciones, respuestas, funciones, y enfermedades inmunitarias no deseables y/o perjudiciales, y similares. Las CPAM pueden proporcionar propiedades y efectos inmunomoduladores beneficiosos que resultan útiles por sí mismos o en terapia complementaria para impedir, prevenir, disminuir, reducir, mejorar, mitigar, tratar, eliminar y/o curar procesos y/o condiciones inmunitarias perjudiciales. Dichos procesos y condiciones incluyen, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, anemias, neoplasmas, HIC, EICH y determinados trastornos inflamatorios, tal como se indica en mayor detalle en otros sitios de la presente memoria. Las CPAM pueden resultar útiles en estos otros aspectos particularmente en mamíferos. En diversos casos a este respecto, las CPAM son utilizadas terapéuticamente en pacientes humanos, con frecuencia complementariamente a otras terapias.

Administración de CPAM

*Preparaciones de CPAM*

Las CPAM pueden prepararse a partir de una diversidad de tejidos, tales como las células de médula ósea, tal como se comenta en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria.

En ciertos casos las preparaciones de CPAM se derivan clonalmente. En principio, las CPAM en estas preparaciones son genéticamente idénticas entre sí y, en caso de prepararse y mantenerse apropiadamente, se encuentran libres de otras células.

En ciertos casos se pueden utilizar las preparaciones de CPAM que son menos puras que estas. Aunque raras, pueden aparecer poblaciones menos puras en el caso de que la etapa de clonación inicial requiera más de una célula. En el caso de que estas no sean todas CPAM, la expansión producirá una población mixta en la que las CPAM son solo uno de por lo menos dos tipos de células. Con más frecuencia, aparecen poblaciones mixtas al administrarse CPAM en mezcla con otro u otros tipos de células.

En muchos casos la pureza de las CPAM para la administración en un sujeto es de aproximadamente 100 %. En otro caso es de 95 % a 100 %. En algunos casos es de 85 % a 95 %. Particularmente en el caso de mezclas con otras células, el porcentaje de CPAM puede ser de 25 % a 30 %, de 30 % a 35 %, de 35 % a 40 %, de 40 % a 45 %, de 45 % a 50 %, de 60 % a 70 %, de 70 % a 80 %, de 80 % a 90 % o de 90 % a 95 %.

El número de CPAM en un volumen dado puede determinarse mediante procedimientos e instrumentación bien conocidos y rutinarios. El porcentaje de CPAM en un volumen dado de una mezcla de células puede determinarse mediante procedimientos en gran parte iguales. Las células pueden contarse fácilmente de manera manual o mediante la utilización de un contador de células automático. Pueden determinarse las células específicas en un volumen dado utilizando procedimientos específicos de tinción y examen visual y mediante procedimientos automatizados utilizando un reactivo de unión específico, típicamente anticuerpos, etiquetas fluorescentes y un separador celular activado por fluorescencia.

La inmunomodulación de CPAM puede implicar CPAM no diferenciadas. Puede implicar CPAM que están comprometidas a una ruta de diferenciación. Dicha inmunomodulación puede implicar además CPAM que se han diferenciado en una célula madre menos potente con un potencial de diferenciación limitado. También puede implicar CPAM que se han diferenciado en un tipo celular terminalmente diferenciado. El mejor tipo o mezcla de CPAM se determinará a partir de las circunstancias particulares de su utilización, y resultará una cuestión de diseño rutinario para el experto en la materia determinar un tipo o combinación eficaz de CPAM.

#### Formulaciones

La elección de formulación para la administración de CPAM para una aplicación dada dependerá de una diversidad de factores. Destacan entre ellos la especie de sujeto, la naturaleza del trastorno, disfunción o enfermedad bajo tratamiento y su estado y distribución en el sujeto, la naturaleza de otras terapias y agentes que se administran, la vía óptima de administración de las CPAM, la supervivencia de las CPAM por la vía, régimen de administración y otros factores que resultaran evidentes para el experto en la materia. En particular, por ejemplo, la elección de portadores adecuados y otros aditivos dependerán de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma de administración particular, por ejemplo, la forma de administración líquida (p.ej., si la composición debe formularse en una solución, una suspensión, gel u otra forma líquida, tal como una forma de liberación temporal o forma rellena de líquido).

Por ejemplo, la supervivencia celular puede ser un determinante importante de la eficacia de las terapias celulares. Lo anterior es cierto para terapias tanto primarias como complementarias. Otra cuestión aparece en el caso de que los sitios diana no resulten hospitalarios para la implantación y crecimiento celulares. Lo anterior puede bloquear el acceso al sitio y/o la injertación en el mismo de las CPAM terapéuticas. Diversos casos comprenden medidas para incrementar la supervivencia celular y/o para superar los problemas planteados por las barreras a la implantación y/o crecimiento.

Entre los ejemplos de composiciones que comprenden CPAM se incluyen preparaciones líquidas, incluyendo suspensiones y preparaciones para la administración intramuscular o intravenosa (p.ej., la administración inyectable), tal como suspensiones o emulsiones estériles. Dichas composiciones pueden comprender una mezcla de CPAM con un portador, diluyente o excipiente adecuado, tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa, dextrosa o similar. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, y similares. Según la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos estándares, tales como "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE," 17a edición, 1985, para preparar preparaciones adecuadas, sin experimentación indebida.

Las composiciones de la divulgación con frecuencia se proporcionan convenientemente como preparaciones líquidas, p.ej., soluciones acuosas isotónicas, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas, que pueden tamponarse con un pH seleccionado. Las preparaciones líquidas normalmente resultan más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Adicionalmente, las composiciones líquidas resultan algo más convenientes de administrar, especialmente mediante inyección. Las composiciones viscosas, por otra parte, pueden formularse en el intervalo de viscosidades apropiado para proporcionar periodos de contacto más largos con tejidos específicos.



- Con frecuencia se incluyen diversos aditivos para potenciar la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, tales como conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones, entre otros. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, resulta deseable
- 5 incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la utilización de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo el monoestearato de aluminio y la gelatina. Según la presente divulgación, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado debería ser compatible con las células.
- Las soluciones, suspensiones y geles de CPAM normalmente contienen una cantidad importante de agua (preferentemente agua esterilizada y purificada) además de las células. También pueden encontrarse presentes cantidades menores de otros ingredientes, tales como ajustadores de pH (p.ej., una base, tal como NaOH), emulsionantes o agentes dispersantes, agentes tamponadores, conservantes, agentes humectantes y agentes
- 10 gelificantes (p.ej., metilcelulosa).
- Típicamente, las composiciones son isotónicas, es decir, presentan la misma presión osmótica que la sangre y el líquido lacrimal al prepararlas apropiadamente para la administración.
- 15 La isotonicidad deseada de las composiciones de la presente divulgación puede conseguirse utilizando cloruro sódico, u otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro sódico resulta preferente particularmente para tampones que contienen iones sodio.
- La viscosidad de las composiciones, si se desea, puede mantenerse en el nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. La metilcelulosa resulta preferente debido a que se encuentra fácil y económicamente disponible y resulta fácil de trabajar con ella. Entre otros agentes espesantes adecuados se incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferente del espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es utilizar una cantidad que
- 20 conseguirá la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas normalmente se preparan a partir de soluciones mediante la adición de dichos agentes espesantes.
- Puede utilizarse un conservante o estabilizador celular farmacéuticamente aceptable para incrementar la vida de las composiciones de CPAM. En el caso de que se incluyan dichos conservantes, se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto en la materia seleccionar composiciones que no afectaran a la
- 25 viabilidad o eficacia de las CPAM.
- El experto en la materia reconocerá que los componentes de las composiciones deberían ser químicamente inertes. Lo anterior no supondrá ningún problema para el experto en los principios químicos y farmacéuticos. Pueden evitarse fácilmente problemas haciendo referencia a libros estándares o mediante experimentos simples (que no implican experimentación indebida) utilizando información proporcionada por la exposición, los documentos citados en la
- 30 presente memoria y disponibles generalmente en la técnica.
- Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de las células utilizadas en la práctica de la presente divulgación en la cantidad requerida del solvente apropiado con diversas cantidades de los demás ingredientes, según se desee.
- En algunos casos las CPAM se formulan en una forma inyectable de dosis unitaria, tal como una solución, suspensión o emulsión. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la inyección de CPAM típicamente son soluciones y dispersiones acuosas estériles. Los portadores para las formulaciones inyectables pueden ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.
- 40 El experto en la materia podrá determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o portadores opcionales en composiciones que deben administrarse en procedimientos de la divulgación. Típicamente, cualesquiera aditivos (además de las células) se encuentran presentes en una cantidad de 0,001 % a 50 % en peso en solución, tal como en solución salina tamponada con fosfato. El ingrediente activo se encuentra presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como entre aproximadamente 0,0001 % y aproximadamente 5 % en peso, preferentemente entre aproximadamente 0,0001 % y aproximadamente 1 %, mas preferentemente entre
- 45 aproximadamente 0,0001 % y aproximadamente 0,05 % en peso o entre aproximadamente 0,001 % y aproximadamente 20 % en peso, preferentemente entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 10 % en peso, y lo mas preferentemente entre aproximadamente 0,05 % y aproximadamente 5 % en peso.
- Para cualquier composición que debe administrarse en un animal o ser humano, y para cualquier procedimiento particular de administración, resulta preferente determinar, por lo tanto, la toxicidad, tal como mediante la
- 50 determinación de la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo animal adecuado, p.ej., un roedor, tal como un ratón o rata, y la dosis de la composición o composiciones, la concentración de componentes en las mismas, y la temporización de la administración de la composición o composiciones, que inducen una respuesta adecuada. Dichas determinaciones no requieren experimentación indebida a partir de los conocimientos del experto en la materia, dicha exposición, y los

documentos citados en la misma. Y los tiempos para las administraciones secuenciales pueden determinarse sin experimentación indebida.

En algunos casos las CPAM son encapsuladas para la administración, particularmente en donde el encapsulado potencia la eficacia de la terapia, o proporciona ventajas de manipulación y/o vida útil. El encapsulado, en algunos casos donde incrementa la eficacia de la inmunosupresión mediada por CPAM, puede, en consecuencia, reducir también la necesidad de terapia farmacológica inmunosupresora.

Además, el encapsulado en algunos casos proporciona una barrera al sistema inmunitario del sujeto que puede reducir adicionalmente la respuesta inmunitaria del sujeto a las CPAM (que generalmente no son inmunogénicas o son solo débilmente inmunogénicas en trasplantes alogénicos), reduciendo de esta manera cualquier rechazo del injerto o inflamación que podría producirse con la administración de las células.

En una variedad de caso en los que las CPAM se administren mezcladas con células de otro tipo, que son mas típicamente inmunogénicas en un contexto alogénico o xenogénico, el encapsulado puede reducir o eliminar respuestas inmunitarias adversas del huésped a las células no CPAM y/o la EICH que podría producirse en un huésped inmunocomprometido en el caso de que las células mezcladas sean inmunocompetentes y reconozcan el huésped como no propio.

Las CPAM pueden encapsularse con membranas, así como capsulas, antes de la implantación. Se encuentra contemplado que pueda utilizarse cualquiera de los muchos procedimientos de encapsulado celular disponibles. En algunos casos las células son encapsuladas individualmente. En algunos casos, las células son encapsuladas dentro de la misma membrana. En el caso de que las células deban extraerse después de la implantación, una estructura de tamaño relativamente grande que encapsule muchas células, tal como dentro de una única membrana, puede proporcionar un medio conveniente para la extracción.

En diversos casos puede utilizarse una amplia diversidad de materiales para el microencapsulado de las CPAM. Entre dichos materiales se incluyen, por ejemplo, capsulas de polímero, microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, capsulas de alginato de poli-L-lisina bario, capsulas de alginato de bario, fibras huecas de poliacrilonitrilo/cloruro de polivinilo (PAN/PVC) y fibras huecas de polietersulfona (PES).

Las técnicas para el microencapsulado de células que pueden utilizarse para la administración de CPAM son conocidas por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo, la patente US n° 5.639.275 (que, por ejemplo, se describe una capsula biocompatible para el mantenimiento a largo plazo de células que expresan establemente moléculas biológicamente activas). Se proporcionan procedimientos adicionales de encapsulado en la publicación de patente europea n° 301.777 y en las patentes US n° 4.353.888, n° 4.744.933, n° 4.749.620, n° 4.814.274, n° 5.084.350, n° 5.089.272, n° 5.578.442, n° 5.639.275, y n° 5.676.943.

Ciertos casos incorporan las CPAM en un polímero, tal como un biopolímero o polímero sintético. Entre los ejemplos de biopolímeros se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Otros factores, tales como las citoquinas comentadas anteriormente, también pueden incorporarse en el polímero. Las CPAM pueden incorporarse en los intersticios de un gel tridimensional. Típicamente, se implanta quirúrgicamente un polímero o gel grande. Un polímero o gel que puede formularse en partículas o fibras suficientemente pequeñas puede administrarse mediante otras vías no quirúrgicas comunes mas convenientes.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden prepararse en muchas formas, incluyendo tabletas, capsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, suspensiones y liposomas, y otras formulaciones de liberación lenta, tal como geles poliméricos conformados. Las composiciones farmacéuticas líquidas orales pueden encontrarse en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas o aceitosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse en forma de un producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de la utilización. Dichas composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes. Puede formularse una forma de dosis oral de manera que las células resultan liberadas en el intestino después de pasar por el estomago. Dichas formulaciones se describen en la patente US n° 6.306.434, y en las referencias contenidas en la misma.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal en forma de supositorios monodosis. Entre los portadores adecuados se incluyen una solución salina y otros materiales utilizados comúnmente en la técnica.

Para la administración mediante inhalación, las células pueden derivarse convenientemente a partir de un insufador, nebulizador o un paquete presurizado u otros medios convenientes de administración de un spray aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida.

Alternativamente, para la administración mediante inhalación o insufado, unos medios pueden adoptar la forma de una composición de polvos secos, por ejemplo una mezcla de polvos de un modulador y una base de polvos adecuada,

tal como lactosa o almidón. La composición de polvos puede presentarse en forma de dosis unitaria en, por ejemplo, capsulas o cartuchos o, p.ej., gelatina o paquetes blíster a partir de los cuales pueden administrarse los polvos con ayuda de un inhalador o insuflador. Para la administración intranasal, pueden administrarse células mediante un spray líquido, tal como mediante un atomizador de botella de plástico.

## 5 *Otros ingredientes activos*

Las CPAM pueden administrarse con otros agentes farmacéuticamente activos. En algunos casos se formulan uno o mas de dichos agentes junto con las CPAM para la administración. En algunos casos las CPAM y el agente o agentes en encuentran en formulaciones separadas. En algunos casos las composiciones que comprenden las CPAM y/o el agente o agentes se formulan con respecto a la utilización complementaria de una con otra.

- 10 Las CPAM pueden administrarse en una formulación que comprende un agente inmunosupresor, tal como cualquier combinación de cualquier numero de un corticoesteroide, ciclosporina A, un agente inmunosupresor de tipo ciclosporina, ciclofosfamida, globulina antitimocito, azatioprina, rapamicina, FK-506 y un agente inmunosupresor de tipo macrólido diferente de FK-506 y rapamicina. En ciertos casos tales agentes incluyen un corticoesteroide, ciclosporina A, azatioprina, ciclofosfamida, rapamicina y/o FK-506. Los agentes inmunosupresores de acuerdo con lo
- 15 anteriormente expuesto pueden ser el único agente adicional de este tipo o pueden combinarse con otros agentes, tales como otros agentes indicados en la presente memoria. Entre otros agentes inmunosupresores se incluyen tacrolimus, micofenolato mofetilo y sirolimus.

- Entre dichos agentes se incluyen además agentes antibióticos, agentes antifúngicos y agentes antivíricos, entre otras sustancias y composiciones farmacológicamente activas que se puede utilizar de acuerdo con los casos de la divulgación.
- 20

Entre los compuestos antibióticos o antimicóticos típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, penicilina, estreptomicina, anfotericina, ampicilina, gentamicina, canamicina, ácido micofenólico, ácido nalidixico, neomicina, nistatina, paramomicina, polimixina, puromicina, rifampicina, espectinomicina, tetraciclina, tilosina, zeocina y cefalosporinas, aminoglucosidos y equinocandinas.

- 25 Los aditivos adicionales de este tipo se relacionan con el hecho de que las CPAM, como otras células madre, tras la administración en un sujeto pueden "localizarse" en un medio favorable a su crecimiento y función. Dicha "localización" con frecuencia concentra las células en sitios en donde resultan necesarios, tales como sitios de trastorno, disfunción o enfermedad inmunitaria. Es conocido que varias sustancias estimulan la localización. Entre ellas se incluyen factores de crecimiento y agentes de señalización trófica, tales como citoquinas. Pueden utilizarse para estimular la localización de CPAM en sitios que son dianas terapéuticas. Pueden administrarse en el sujeto antes del tratamiento con CPAM, junto con CPAM o después de la administración de CPAM.
- 30

- Determinadas citoquinas, por ejemplo, alteran o afectan la migración de las CPAM o sus contrapartidas diferenciadas a sitios que requieren terapia, tal como sitios inmunocomprometidos. Entre las citoquinas que pueden utilizarse en este aspecto se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, factor-1 derivado de células estromales (SDF-1), factor de células madre (SCF), angiopoyetina-1, factor de crecimiento de plaquetas (PIGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), citoquinas que estimulan la expresión de moléculas de adhesión endotelial, tales como las ICAM y las VCAM, y citoquinas que generan o facilitan la localización.
- 35

- Pueden administrarse en el sujeto como pretratamiento, junto con las CPAM, o después de la administración de las CPAM, para estimular la localización en sitios deseados y para conseguir un efecto terapéutico mejorado, mediante una localización mejorada o mediante otros mecanismos. Dichos factores pueden combinarse con las CPAM en una formulación adecuada para que se administren juntos. Alternativamente, dichos factores pueden formularse y administrarse por separado.
- 40

- El orden de administración, las formulaciones, las dosis, la frecuencia de administración y las vías de administración de factores (tales como las citoquinas comentadas anteriormente) y las CPAM, generalmente variaran con el trastorno o enfermedad bajo tratamiento, su severidad, el sujeto, otras terapias que se administran, el estadio del trastorno o enfermedad, y los factores pronósticos, entre otros. Los regímenes generales que se han establecido para otros tratamientos proporcionan un marco para determinar la dosis apropiada en la terapia directa o complementaria mediada por CPAM. Estos, junto con la información adicional proporcionada en la presente memoria, permitirán al experto en la materia determinar los procedimientos de administración apropiados, sin necesidad de experimentación
- 45
- 50 indebida.

## *Vías*

Las CPAM pueden administrarse en el sujeto mediante cualquiera de una diversidad de vías conocidas por el experto en la materia que pueden utilizarse para administrar células en un sujeto.

- 55 Entre los procedimientos que pueden utilizarse en este aspecto se encuentran procedimientos para administrar CPAM por una vía parenteral. Las vías de administración parenterales útiles en varios casos incluyen, entre otras, la administración por inyección intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal, intratecal, intraósea, intraarticular,

intrasinovial, intracutánea, intradérmica, subcutánea y/o intramuscular. En algunos casos, se utilizan inyecciones intravenosas, intraarteriales, intracutáneas, intradérmicas, subcutáneas y/o intramusculares. En algunos casos, se utilizan inyecciones intravenosas, intraarteriales, intracutáneas, subcutáneas y/o intramusculares.

5 En diversos casos las CPAM se administran mediante inyección sistémica. La inyección sistémica, tal como la inyección intravenosa, ofrece una de las vías mas simples y menos invasivas para administrar las CPAM. En algunos casos, dichas vías pueden requerir elevadas dosis de CPAM para una eficacia y/o localización optima de las CPAM a los sitios diana. En una variedad de casos las CPAM pueden administrarse mediante inyecciones dirigidas y/o localizadas para garantizar un efecto optimo en los sitios diana.

10 Las CPAM pueden administrarse en el sujeto mediante una aguja hipodérmica con una jeringa en algunos casos. En diversos casos las CPAM se administran en el sujeto mediante un catéter. En una variedad de casos las CPAM se administran mediante implantación quirúrgica. Adicionalmente en este aspecto, en diversos casos las CPAM se administran en el sujeto mediante implantación utilizando un procedimiento artroscópico. En algunos casos las CPAM se administran en el sujeto en o sobre un soporte solido, tal como un polímero o gel. En diversos casos las CPAM se administran en el sujeto en una forma encapsulada.

15 En casos adicionales las CPAM se formulan convenientemente para la administración oral, rectal, epicutánea, ocular, nasal y/o pulmonar y se administran correspondientemente.

### Dosificación

20 Las composiciones pueden administrarse en dosificaciones dosis y mediante técnicas bien conocidas por el experto en las técnicas medicas y veterinarias, considerando factores tales como la edad, el sexo, el peso y la condición del paciente particular, y la formulación que se administrara (p.ej., solida vs. líquida). Las dosis para los seres humanos y otros mamíferos podrán ser determinadas sin necesidad de experimentación indebida por el experto en la materia, a partir de la presente exposición, los documentos citados en la presente memoria y los conocimientos en la técnica.

25 La dosis de CPAM apropiada para la utilización dependerá de numerosos factores. Puede variar considerablemente Según las diferentes circunstancias. Los parámetros que determinaran las dosis optimas de CPAM que deben administrarse para la terapia primaria y complementaria generalmente incluirán algunos o todos los siguientes: la enfermedad bajo tratamiento y su estadio, la especie del sujeto, su salud, genero, edad, peso y tasa metabólica, la inmunocompetencia del sujeto, otras terapias que se administran, y las complicaciones potenciales que se esperan a partir de la historia o genotipo del sujeto. Los parámetros pueden incluir, además: si las CPAM son singénicas, autólogas, alogénicas o xenogénicas, su potencia (actividad específica), el sitio y/o distribución que debe ser localizada por las CPAM para resultar eficaces, y características del sitio tales como la accesibilidad para las CPAM y/o la inyectación de las CPAM. Entre los parámetros adicionales se incluyen la coadministración con CPAM de otros factores (tales como factores de crecimiento y citoquinas). La dosis optima en una situación dada también considerara el modo en que se formulan las células, el modo en que se administran y el grado en que las células se localizaran en los sitios diana tras la administración. Finalmente, la determinación de las dosis optimas necesariamente proporcionara una dosis eficaz que ni es inferior al umbral de efecto beneficioso máximo ni superior al umbral en que los efectos perjudiciales asociados a la dosis de CPAM superan las ventajas de la dosis incrementada.

40 La dosis optima de las CPAM para algunos casos estará en el intervalo de dosis utilizado para el trasplante de medula ósea mononuclear autólogo. Para preparaciones bastante puras de CPAM, las dosis optimas en diversos casos estarán en el intervalo entre  $10^4$  y  $10^8$  células CPAM/kg de masa receptora por cada administración. En algunos casos la dosis optima por cada administración estará entre  $10^5$  y  $10^7$  células CPAM/kg. En muchos casos la dosis optima por cada administración estará entre  $5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^6$  células CPAM/kg. A título de referencia, las dosis mas altas en lo anteriormente expuesto son análogas a las dosis de células nucleadas utilizadas en el trasplante autólogo de medula ósea mononuclear. Algunas de las dosis mas bajas son análogas al numero de células CD34<sup>+</sup>/kg utilizadas en el trasplante autólogo de medula ósea mononuclear.

45 Debe apreciarse que puede administrarse una única dosis de una vez, fraccionadamente o continuamente durante un periodo de tiempo. La dosis entera también puede administrarse en una única localización o extenderse fraccionadamente en varias localizaciones.

50 En diversos casos las CPAM pueden administrarse en una dosis inicial y después mantenerse mediante la administración adicional de CPAM. Las CPAM pueden administrarse mediante un procedimiento inicialmente y después administrarse mediante el mismo procedimiento o uno o mas procedimientos diferentes. Los niveles de CPAM del sujeto pueden mantenerse mediante la administración continua de células. Diversos casos administran las CPAM bien sea inicialmente o para mantener su nivel en el sujeto o ambos mediante inyección intravenosa. En una variedad de casos, se utilizan otras formas de administración, Según la condición del paciente y otros factores, comentados en otros sitios en la presente memoria.

55 Se indica que los sujetos humanos se tratan durante generalmente mas tiempo que los animales experimentales, aunque el tratamiento generalmente presenta una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y la eficacia del tratamiento. El experto en la materia considerara lo anterior al utilizar los resultados de otros procedimientos llevados a cabo en seres humanos y/o en animales, tales como ratas, ratones, primates no humanos

y similares, a fin de determinar las dosis apropiadas para el ser humano. Dichas determinaciones, basadas en dichas consideraciones y considerando las guías proporcionadas en la presente exposición y en la técnica anterior, permitirán al experto en la materia llevar a cabo lo anterior sin necesidad de experimentación indebida.

5 Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis adicionales o para administraciones secuenciales pueden ser todos iguales o pueden ser variables. Los regímenes apropiados podrán ser determinados por el experto en la materia, a partir de la presente exposición, los documentos citados en la presente memoria y los conocimientos en la técnica.

10 La dosis, frecuencia y duración del tratamiento dependerá de muchos factores, incluyendo la naturaleza de la enfermedad, el sujeto y otras terapias que pueden administrarse. De acuerdo con lo anterior, puede utilizarse una amplia diversidad de regímenes para administrar las CPAM.

En algunos casos las CPAM se administran en el sujeto en una dosis. En otros, las CPAM se administran en el sujeto en una serie de dos o mas dosis sucesivas. En algunos otros casos las CPAM se administran en una única dosis, en dos dosis, y/o en mas de dosis; las dosis pueden ser iguales o diferentes, y se administran a intervalos iguales o desiguales entre ellos.

15 Las CPAM pueden administrarse en muchas frecuencias durante un amplio intervalo de tiempos. En algunos casos las CPAM se administran durante un periodo de menos de un día. En otros casos las CPAM se administran durante dos, tres, cuatro, cinco o seis días. En algunos casos las CPAM se administran una o mas veces por semana, durante un periodo de semanas. En otros casos las CPAM se administran durante un periodo de semanas a uno o varios meses. En diversos casos pueden administrarse durante un periodo de meses. En otros, pueden administrarse durante un periodo de uno o mas años. Generalmente, las duraciones de tratamiento serán proporcionales a la duración del proceso de la enfermedad, a la eficacia de las terapias que se apliquen y a la condición y respuesta del sujeto bajo tratamiento.

#### Usos terapéuticos de CPAM inmunomoduladoras

25 Las propiedades inmunomoduladoras de las CPAM pueden utilizarse en el tratamiento de una amplia diversidad de trastornos, disfunciones y enfermedades, tales como las que, intrínsecamente, como efecto secundario o como un efecto secundario del tratamiento, se presentan con procesos y efectos del sistema inmunitario perjudiciales. Se comentan varias ilustraciones posteriormente.

30 Muchos casos a este respecto implican administrar las CPAM en un sujeto que presenta un sistema inmunitario debilitado (o comprometido), como terapia única o como terapia complementaria con otro tratamiento. En una variedad de casos a este respecto, las CPAM se administran a un sujeto complementariamente a terapia de radiación o quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapias que han sido administradas, se están administrando o se administraran en el sujeto. En muchos de tales casos, la terapia de radiación, la quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapias, son parte de una terapia de trasplante. Y en una variedad de casos las CPAM se administran para tratar una respuesta inmunitaria perjudicial, tal como HIC o EICH.

35 En una variedad de casos a este respecto, el sujeto es el receptor de un trasplante de células de medula ósea o células sanguíneas no singénico, típicamente alogénico; el sistema inmunitario del sujeto ha sido debilitado o anulado mediante terapia de radiación, quimioterapia o una combinación de radiación y quimioterapia; se están administrando en el sujeto fármacos inmunosupresores; el sujeto esta en riesgo de desarrollar, o ha desarrollado, enfermedad de injerto contra el huésped, y las CPAM se administran en el sujeto complementariamente a una o mas cualesquiera de trasplante, terapia de radiación y/o quimioterapia, y los fármacos inmunosupresores para tratar, tal como mejorar, 40 detener o eliminar, la enfermedad del injerto contra el huésped en el sujeto.

#### Neoplasmas

45 El termino "neoplasma" denota generalmente trastornos que implican la proliferación clonal de células. Los neoplasmas pueden ser benignos, es decir, no progresivos y no recurrente, y en este caso, generalmente no son potencialmente letales. Los neoplasmas también pueden ser malignos, es decir, se agravan progresivamente, se extienden y, como regla general, son potencialmente letales y con frecuencia son fatales.

50 En diversos casos las CPAM se administran en el sujeto que sufre de un neoplasma, complementariamente a un tratamiento del mismo. Por ejemplo, en algunos casos a este respecto, el sujeto que esta en riesgo de sufrir o que esta sufriendo de un neoplasma de células sanguíneas o de medula ósea y que ha sido sometido o se someterá a un trasplante de sangre o medula ósea. Utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria para el aislamiento, caracterización y expansión de las CPAM, junto con las exposiciones en la presente memoria sobre las propiedades inmunosupresoras de las CPAM, se administran CPAM para tratar, tal como prevenir, suprimir o reducir, las reacciones inmunitarias perjudiciales, tales como HIC y EICH, que podrán complicar la terapia de trasplante.

55 En una variedad de casos que involucran terapias de trasplante, las CPAM pueden utilizarse solas con un propósito inmunosupresor, o junto con otros agentes. Las CPAM pueden administrarse antes, durante o después de uno o mas trasplantes. En el caso de que se administren durante el trasplante, las CPAM pueden administrarse por separado o

junto con el material de trasplante. En el caso de que se administren por separado, las CPAM pueden administrarse secuencial o simultáneamente con los demás materiales de trasplante. Además, las CPAM pueden administrarse mucho antes del trasplante y/o mucho después, alternativamente o adicionalmente a la administración en el tiempo o aproximadamente en el tiempo de la administración del trasplante.

- 5 Otros agentes que pueden utilizarse junto con las CPAM, en terapias de trasplante en particular, incluyendo agentes inmunomoduladores, tales como los indicados en otros sitios en la presente memoria, particularmente agentes inmunosupresores, mas particularmente los indicados en otros sitios en la presente memoria, especialmente en este aspecto, uno o mas de un corticoesteroide, ciclosporina A, compuesto inmunosupresor de tipo ciclosporina, azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato y un agente anticuerpo monoclonal inmunosupresor.

- 10 Entre los trastornos neoplásicos de la medula ósea que se tratan con las CPAM en este aspecto se encuentran trastornos mieloproliferativos ("TMP"), síndromes (o estados) mielodisplásicos ("SMD"), leucemias y trastornos linfoproliferativos, incluyendo mieloma múltiple y linfomas.

- 15 Los SMP se distinguen por una proliferación aberrante y autónoma de las células en la medula ósea. El trastorno puede implicar únicamente un tipo de célula o varios. Típicamente, los TMP implican tres linajes celulares y son: eritrocítico, granulocítico y trombocítico. La participación de los tres linajes vana de un SMP a otro y entre incidencias de los tipos individuales. Típicamente, resultan afectados de manera diferente y un linaje celular resulta afectado predominantemente en un neoplasma dado. Los SMP no son claramente malignos; sin embargo, se clasifican como neoplasmas y se caracterizan por una autorreplicación aberrante de las células precursoras hematopoyéticas en la medula ósea. Los SMP presentan el potencial, sin embargo, de desarrollarse en leucemias agudas.

- 20 Los SMD, al igual que los SMP, son trastornos clonales, y se caracterizan por una autorreplicación aberrante de las células precursoras hematopoyéticas en la medula ósea. Al igual que los SMD, pueden desarrollarse en leucemias agudas. La mayoría, aunque no todos, los SMD se manifiestan en citopenias de sangre periférica (la leucemia mielomonocítica crónica es la excepción), mientras que los SMP, no.

- 25 Las manifestaciones de laboratorio y clínicas de dichos trastornos pueden variar con su curso y entre incidencias individuales. Las manifestaciones pueden solaparse y puede resultar difícil realizar un determinado diagnostico que distinga una enfermedad del resto de enfermedades. El diagnostico de neoplasmas de células hematopoyéticas de medula ósea requiere, de esta manera, especial cuidado, de manera que no se diagnostique incorrectamente como un trastorno benigno un trastorno que en realidad es letalmente maligno.

- 30 Las enfermedades siguientes son de entre los trastornos mieloproliferativos (TMP) que pueden tratarse con CPAM, típica o complementariamente: leucemia mielocítica crónica ("LMC")/leucemia granulocítica crónica ("LGC"), mielofibrosis agnogenica, trombocitemia esencial y policitemia vera.

Las enfermedades siguientes son de los síndromes mielodisplásicos (SMD) que pueden tratarse con CPAM, típica o complementariamente: anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación y leucemia mielomonocítica crónica.

- 35 Las enfermedades siguientes se encuentran entre los trastornos linfoproliferativos, incluyendo mielomas múltiples y linfomas, que pueden tratarse con CPAM, típicamente de manera complementaria: leucemia linfoblástica aguda pre-B, leucemia linfocítica crónica ("LLC"), linfoma de células B, leucemia de células pilosas, mieloma, mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda de células T, linfoma de células T periféricas, otras leucemias linfoides y otros linfomas.

- 40 También entre los neoplasmas que pueden tratarse con CPAM, típicamente de manera complementaria, se encuentran los siguientes: neoplasma benigno de células de medula ósea, un trastorno mieloproliferativo, un síndrome mielodisplásico, o una leucemia aguda, leucemia mielocítica crónica ("LMC") (también denominada leucemia granulocítica crónica ("LGC")), mielofibrosis agnogenica, trombocitemia esencial, policitemia vera, otros trastornos mieloproliferativos, mieloma múltiple agudo, leucemia mieloblástica, leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda pre-B, leucemia linfocítica crónica ("LLC"), linfoma de células B, leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda de células T, linfoma de células T periféricas, otras leucemias linfoides, otros linfomas u otra leucemia aguda.

Las CPAM para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 15 pueden administrarse de forma complementaria a un tratamiento para cualquiera de las enfermedades anteriormente indicadas.

#### Tratamientos que implican la inmunoablación o compromiso

- 50 Las leucemias agudas con frecuencia resultan difíciles de tratar mediante procedimientos que han resultado eficaces para otras neoplasias malignas. Lo anterior se debe en parte a la movilidad de las células de la medula ósea, incluyendo las de un neoplasma. En particular puede deberse a la distribución difusa de la medula ósea en todo el esqueleto. Y en parte se debe, sin duda, a la naturaleza de las células mismas y su transformación.

- 55 Actualmente, un tratamiento estándar para las neoplasias malignas hematológicas implica la ablación de la totalidad de las células hematopoyéticas en el paciente. No existe ningún modo de llevar a cabo lo anterior sin realizar también

- la ablación de las células hematopoyéticas sanas del paciente. Típicamente, el paciente se trata mediante quimiorradioterapia en dosis suficientemente elevadas para eliminar virtualmente la totalidad de las células de la médula ósea, tanto normales como neoplásicas. Los efectos secundarios del tratamiento son severos, y sus efectos sobre los pacientes son desagradables, dolorosos y física y emocionalmente debilitantes. El tratamiento no solo elimina el tejido y células enfermos, sino que también eviscera el sistema hematopoyético y sistema inmunitario del paciente. El tratamiento deja al paciente comprometido, dependiente de transfusiones y por lo tanto altamente susceptible a infección, de manera que incluso una exposición de otro modo menor a un agente infeccioso puede resultar fatal.
- La capacidad hematopoyética normal se restaura posteriormente mediante trasplantes autólogos o alogénicos de sangre periférica o médula ósea. Desafortunadamente, el sistema inmunitario del paciente no solo resulta severamente comprometido por el tratamiento ablativo, sino también en el caso del trasplante alogénico, por la supresión inmunitaria intencionada para evitar el rechazo del trasplante y garantizar la injertación y proliferación de las nuevas células madre hematopoyéticas que repoblarán la médula del paciente y regenerarán los sistemas hematopoyético e inmunitario del paciente.
- Se han encontrado muchas complicaciones para llevar a cabo dichos trasplantes para regenerar los sistemas hematopoyético e inmunitario en un huésped inmunocomprometido. Una es el rechazo por células y procesos inmunocompetentes residuales en el huésped, denominado en la presente memoria respuesta HIC. Otra resulta inducida por células inmunocompetentes en el injerto, denominada en la presente memoria EICH.
- Estas complicaciones podrían evitarse utilizando material del donante singénico o autólogo. Sin embargo, los donantes singénicos son raros y los trasplantes autólogos presentan un riesgo elevado de recurrencia de la enfermedad. Por lo tanto, los trasplantes generalmente utilizan células y tejidos alogénicos obtenidos de un donante de HLA compatible. Desafortunadamente, dicho procedimiento resulta en EICH de leve a severa en aquellos que reciben esta forma de terapia. En el caso de que no se alivie por lo menos, dichas reacciones inmunitarias resultarían en el fallo de la terapia de trasplante y pueden ellas mismas resultar fatales para el paciente.
- Se ha desarrollado una diversidad de agentes para suprimir las respuestas inmunitarias que alivian las complicaciones del injerto, tales como HIC y EICH, tal como se han comentado anteriormente en la presente memoria. Algunas resultan suficientemente eficaces para reducir las reacciones inmunitarias adversas hasta un nivel gestionable en algunas terapias de trasplante, tales como el trasplante de médula ósea y de sangre periférica. Estos agentes han mejorado el pronóstico para los pacientes de trasplante, en algún grado, aunque, ninguno de ellos resulta totalmente eficaz, y la totalidad de ellos presenta desventajas bastante sustanciales.
- Se ha encontrado (tal como se indica en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria) que las CPAM no provocan una respuesta inmunitaria en huéspedes alogénicos. El trasplante de CPAM en un huésped alogénico no engendra, de esta manera, un rechazo de injerto alogénico (es decir, HIC).
- Además, también se ha encontrado que las CPAM alogénicas pueden administrarse en un huésped a concentración elevada sin producir efectos perjudiciales sobre la respiración
- Además, se ha encontrado (tal como se indica en mayor detalle en otros sitios en la presente memoria) que las CPAM pueden modular respuestas inmunitarias. En particular a este respecto, se ha encontrado que las CPAM pueden suprimir respuestas inmunitarias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, respuestas inmunitarias implicadas en, por ejemplo, HIC y EICH, entre otras. En un detalle particular todavía más detallado en este aspecto, se ha encontrado que las CPAM pueden suprimir la proliferación de las células T, incluso en presencia de potentes estimuladores de células T, tales como la concanavalina A y las células estimuladoras alogénicas o xenogénicas.
- Además, se ha encontrado que incluso cantidades relativamente pequeñas de CPAM pueden suprimir dichas respuestas. En efecto, solo 3 % de CPAM en reacciones de linfocitos mixtos resulta suficiente para reducir las respuestas de células T en 50 % *in vitro*.
- De acuerdo con lo anteriormente descrito, se dan a conocer en la presente memoria composiciones y procedimientos y similares para el tratamiento, tal como para aliviar y/o curar o eliminar, neoplasmas, tales como neoplasmas de células hematopoyéticas, particularmente los de la médula ósea.
- Entre ellas se encuentran las que son trastornos mieloproliferativos (TMP), tales como leucemia mielocítica crónica (también denominada "leucemia granulocítica crónica" y "LGC"), mielofibrosis agnógena, trombocitemia esencial, policitemia vera; síndromes mielodisplásicos (SMD), tales como anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, leucemia mielomonocítica crónica y neoplasmas claramente malignos, las leucemias agudas, tales como la leucemia mieloblástica aguda, leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda B, LLC, linfoma de células B, leucemia de células pilosas, mieloma, leucemia linfoblástica aguda de células T, linfoma de células T periféricas y otras leucemia linfoides y linfomas.
- Las CPAM para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 15 pueden administrarse de forma complementaria a un tratamiento para cualquiera de las enfermedades anteriormente indicadas.

Anemias y otros trastornos sanguíneos

Pueden utilizarse CPAM para tratar una anemia u otro trastorno sanguíneo, con frecuencia complementariamente. Las CPAM pueden utilizarse para tratar las anemias y/o trastornos sanguíneos siguientes, solas o, típicamente, complementariamente: hemoglobinopatías, talasemia, síndrome de fallo de la médula ósea, anemia de células falciformes, anemia aplásica o una anemia hemolítica inmunitaria. Además, entre los trastornos se incluyen anemia refractaria, anemia refractaria con sideroblastos anillados, anemia refractaria con exceso de blastos, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, leucemia mielomonocítica crónica u otro síndrome mielodisplásico, y en algunos casos, anemia de Fanconi.

Las CPAM para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 15 pueden administrarse de forma complementaria a un tratamiento para cualquiera de las enfermedades anteriormente indicadas.

Enfermedades inmunitarias

También se divulga el uso de inmunomodulación de las CPAM para tratar una disfunción, trastorno o enfermedad inmunitaria, solas o como una terapia complementaria. Casos a este respecto se refieren a deficiencias inmunitarias congénitas y disfunciones, trastornos y enfermedades autoinmunitarios. Diversos casos se refieren, al respecto, a la utilización de CPAM para tratar, solas o complementariamente, la enfermedad de Crohn, síndrome de Guillain-Barre, lupus eritematoso (también denominado "LES" y lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple, miastenia grave, neuritis óptica, soriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis de Ord, diabetes mellitus (tipo 1), síndrome de Reiter, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de anticuerpos antifosfolípido ("SAA"), síndrome opsoclonus-mioclónus ("SOM"), arteritis temporal, encefalomiелitis diseminada aguda ("EMAD" y "EAD"), síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, enfermedad celíaca, pénfigo, poliartritis y anemia hemolítica autoinmunitaria caliente.

Los casos particulares entre estos se relacionan con la enfermedad de Crohn, el lupus eritematoso (también denominado "LES" y lupus eritematoso sistémico), esclerosis múltiple, miastenia grave, soriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, diabetes mellitus (tipo 1), síndrome de Reiter, cirrosis biliar primaria, enfermedad celíaca, poliartritis y anemia hemolítica autoinmunitaria caliente.

Además, las CPAM se utilizan en una variedad de casos, en este aspecto, solas y, típicamente, de manera complementaria, para tratar una diversidad de enfermedades que se cree que presentan un componente autoinmunitario, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, casos que pueden usarse para tratar la endometriosis, el tratamiento de endometriosis, cistitis intersticial, neuromiotonía, escleroderma, escleroderma sistémico progresivo, vitiligo, vulvodinia, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, síndrome de fatiga crónica y disautonomía.

Entre los trastornos del sistema inmunitario hereditarios se incluyen la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, IDCG con deficiencia en adenosina desaminasa (IDCG-DAD), IDCG ligada a X, IDCG con ausencia de células T y B, IDCG con ausencia de células T, células B normales, síndrome de Omenn, neutropenias, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, síndrome de Kostmann, mielocatexis, ataxia, telangiectasia, síndrome de linfocitos desnudos, inmunodeficiencia variable común, síndrome de DiGeorge, deficiencia de adhesión leucocitaria y trastornos de los fagocitos (los fagocitos son células inmunitarias que pueden envolver y eliminar organismos foráneos), incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el síndrome de Chediak-Higashi, enfermedad granulomatosa crónica, deficiencia de actina de neutrófilos y digénesis reticular.

Las CPAM para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 15 pueden administrarse de forma complementaria a un tratamiento para cualquiera de las enfermedades anteriormente indicadas.

Enfermedades inflamatorias

Además, pueden utilizarse CPAM para tratar enfermedades inflamatorias, como agente único o complementariamente. En muchos de tales casos las CPAM pueden utilizarse para tratar estados inflamatorios graves, tales como los que se producen por reacción alérgica aguda, o auxiliariamente a otras enfermedades o tratamientos. Mayoritariamente hoy la utilización de las CPAM en este aspecto esta limitada a los casos agudos en los que el sujeto esta en riesgo de gran incapacidad o perdida de vida.

Las CPAM para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 y la reivindicación 15 pueden administrarse de forma complementaria a un tratamiento para cualquiera de las enfermedades anteriormente indicadas.

CPAM tal como se indican en la patente US n° 7.015.037.

Las CPAM humanas se describen en la técnica. Los procedimientos de aislamiento de CPAM para seres humanos y ratones son conocidos de la técnica. Por lo tanto, ahora resulta posible para el experto en la materia obtener aspirados de médula ósea, biopsias de cerebro o hígado, y otros órganos, y el aislamiento de las células utilizando técnicas de selección positiva o negativa disponibles para el experto en la materia, basándose en los genes que se expresan (o no se expresan) en dichas células (p.ej., mediante ensayos funcionales o morfológicos, tales como los dados a conocer en las solicitudes anteriormente indicadas). Dichos procedimientos se describen en, por ejemplo, la patente US n°



7.015.037.

Aislamiento y crecimiento de CPAM tal como se indica en el documento n° PCT/US00/21387.

Los procedimientos de aislamiento de CPAM para seres humanos y ratones son conocidos de la técnica. Se describen en, por ejemplo, la patente US n° 7.015.037, y documentos n° PCT/US00/21387 (publicado como documento n° WO 01/11011) y n° PCT/US02/04652 (publicado como documento n° WO 02/064748).

Las CPAM fueron inicialmente aisladas a partir de medula ósea, aunque posteriormente se establecieron a partir de otros tejidos, incluyendo cerebro y musculo. De esta manera, las CPAM pueden aislarse a partir de múltiples fuentes, incluyendo medula ósea, placenta, cordón umbilical y sangre de cordón, musculo, cerebro, hígado, medula espinal, sangre o piel. Por ejemplo, las CPAM pueden derivarse de aspirados de medula ósea, que pueden obtenerse por medios estándares disponibles para el experto en la materia.

Fenotipo de CPAM humanas bajo las condiciones indicadas en la patente US n° 7.015.037.

El análisis inmunofenotípico mediante FACS de CPAM humanas obtenidas tras 22 a 25 duplicaciones celulares indico que las células no expresan CD31, CD34, CD36, CD38, CD45, CD50, CD62E y -P, HLA-DR, Muc18, STRO-1, cKit, Tie/Tek; y expresan niveles bajos de CD44, HLA-clase I y microglobulina p2, aunque expresan CD10, CD13, CD49b, CD49e, CDw90, Flk1 (N>10).

Una vez las células han pasado por >40 duplicaciones en cultivos sembrados nuevamente a razón de aproximadamente  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ , el fenotipo se volvió mas homogéneo y ninguna célula expresaba HLA clase I o CD44 (n=6). Al cultivar las células a una confluencia mas elevada, expresaron niveles elevados de Muc18, CD44, HLA clase I y microglobulina p2.

La inmunohistoquímica mostro que las CPAM humanas cultivadas a una densidad de siembra de aproximadamente  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$  expresaban EGF-R, TGF-R1 y -2, BMP-R1A, PDGF-R1a y -B, y que una pequeña subpoblación (entre 1 % y 10 %) de las CPAM se tino con los anticuerpos anti-SSEA4.

Utilizando matrices de ADNc Clontech, se determine el perfil génico expresado de las CPAM humanas cultivadas a densidades de siembra de aproximadamente  $2 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^2$  para 22 y 26 duplicaciones celulares.

A. Las CPAM no expresaban CD31, CD36, CD62E, CD62P, CD44-H, cKit, Tie, receptores para IL1, IL3, IL6, IL11, G CSF, GM-CSF, Epo, Flt3-L, o CNTF, y niveles bajos de ARNm de HLA-clase-I, CD44-E y Muc-18.

B. Las CPAM expresaban ARNm para las citoquinas BMP1, BMP5, VEGF, HGF, KGF, MCP1; los receptores de las citoquinas Flk1, EGF-R, PDGF-R1a, gp130, LIF-R, activina-R1 y -R2, TGFR-2 y BMP-R1A, y los receptores de adhesión CD49c, CD49d, CD29 y CD10.

C. Las CPAM expresaban ARNm para hTERT y TRF1; el factor de transcripción del dominio POU, oct-4, sox-2 (requerido con oct-4 para mantener el estado no diferenciado de las células ME/CE Uwanogho D., 1995), sox 11 (desarrollo neuronal), sox 9 (condrogénesis) factores de transcripción de homeodominio: Hox-a4 y -a5 (específicos de esqueleto cervical y torácico; organogenesis del tracto respiratorio), Hox-a9 (mielopoyesis), Dlx4 (específico de cerebro frontal y estructuras periféricas de la cabeza), MSX1 (mesodermo embrionario, corazón y musculo adulto, condrogénesis y osteogénesis) (Foerst-Potts L., 1997), PDX1 (páncreas) (Offield MF, 1996).

D. La presencia de ARNm de oct-4, LIF-R y hTERT se confirmó mediante RT-PCR.

E. Además, la RT-PCR confirmo que el ARNm de rex-1 y el ARNm de rox-1 se expresaban en las CPAM.

Oct-4, rex-1 y rox-1 se expresaban en las CPAM derivadas de medula humana y murina y de hígado y cerebro murinos. La CPAM humanas expresaban LIF-4 y se tiñeron positivamente con SSEA-4. Finalmente, los niveles de ARNm de oct-4, LIF-R y rox-1 se encontró que se incrementaban en las CPAM humanas cultivadas mas allá de 30 duplicaciones celulares, lo que resulto en células fenotípicamente mas homogéneas. En contraste, las CPAM cultivadas a densidad elevada perdieron la expresión de dichos marcadores. Lo anterior estaba asociado a senescencia antes de 40 duplicaciones celulares y la perdida de diferenciación en células diferentes de condroblastos, osteoblastos y adipocitos. De esta manera, la presencia de oct-4 en combinación con rex-1, rox-1 y sox-2 se correlacionaba con la presencia de las células mas primitivas en cultivos de CPAM.

Los procedimientos para cultivar las CPAM son bien conocidos de la técnica. (Ver, por ejemplo, patente US n° 7.015.037). La densidad para cultivar las CPAM puede variar entre aproximadamente 100 células/ $\text{cm}^2$  o aproximadamente 150 células/ $\text{cm}^2$  y aproximadamente 10.000 células/ $\text{cm}^2$ , incluyendo entre aproximadamente 200 células/ $\text{cm}^2$  y aproximadamente 1500 células/ $\text{cm}^2$  o aproximadamente 2000 células/ $\text{cm}^2$ . La densidad puede variar entre especies. Adicionalmente, la densidad optima puede variar Según las condiciones del cultivo y el origen de las células. Se encuentra dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia determinar la densidad optima para un conjunto dado de condiciones de cultivo y células.

Además, pueden utilizarse concentraciones de oxígeno atmosférico efectivo inferiores a aproximadamente 10 %,

incluyendo aproximadamente 3 % a 5 %, en cualquier momento durante el aislamiento, crecimiento y diferenciación de las CPAM en el cultivo.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1: CPAM humanas (de células mononucleares de medula ósea)

5 Se obtuvieron células mononucleares de medula ósea a partir de aspirados de medula ósea de la cresta ilíaca posterior de >80 voluntarios humanos sanos. Se obtuvieron de cada sujeto diez a 100 centímetros cúbicos de medula ósea. Se obtuvieron células mononucleares ("CMN") de medula ósea mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Se incubaron CMN de medula ósea con CD45 y microperlas de glicoforina-A (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) durante 15 minutos y se extrajeron células CD45<sup>+</sup> GlyA<sup>+</sup> situando la muestra frente a un imán SuperMACS. Las células eluidas eran 99,5 % CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup>.

El agotamiento de las células CD45<sup>+</sup> GlyA<sup>+</sup> resultó en la recuperación de células CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup> que constituían aproximadamente 0,05 % a 0,10 % del total de células mononucleares de medula ósea. Se seleccionaron células que no expresaban el antígeno leucocitario común CD45 o el marcador precursor eritroide glucocorticoid-inducible (GlyA). Las células CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup> constituían 1/10<sup>3</sup> de las células mononucleares de medula. Las células CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup> se sembraron en pocillos recubiertos con fibronectina en FCS al 2 %, EGF, PDGF-BB, dexametasona, insulina, ácido linoleico y ácido ascórbico. Tras 7 a 21 días, se desarrollaron grupos pequeños de células adherentes. Según los ensayos de dilución limitante, la frecuencia de células que daba lugar a dichos grupos adherentes era de 1/5 x 10<sup>3</sup> células CD45-GlyA<sup>+</sup>. Al aparecer colonias (aproximadamente 10<sup>3</sup> células), se recuperaron células mediante tripsinización y se sembraron nuevamente cada 3 a 5 días a una dilución 1:4 bajo las mismas condiciones de cultivo. Se mantuvieron las densidades celulares entre 2-8 x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>.

### EJEMPLO 2: CPAM de ratón

Todos los tejidos se obtuvieron siguiendo directrices de la University of Minnesota IACUC. Se obtuvieron células mononucleares de MO (CMNMO) mediante separación con Ficoll Hypaque. La MO se obtuvo de ratones ROSA26 o ratones C57/BL6 de 5-6 semanas de edad. Alternativamente, se obtuvo tejido muscular y cerebral de ratones 129 de 3 días de edad. Los músculos de partes proximales de las patas delanteras y traseras se extrajeron y trituraron a conciencia. El tejido se trató con colagenasa al 0,2 % (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 1 hora a 37°C, seguido de tripsina al 0,1 % (Invitrogen, Grand Island, NY) durante 45 minutos. A continuación, las células se trituraron vigorosamente y se pasaron por un filtro de 70 µm. Se recogieron las suspensiones celulares y se centrifugaron durante 10 minutos a 1600 rpm. El tejido cerebral se diseccionó y se trituró a conciencia. Las células se disociaron mediante incubación con tripsina al 0,1 % y ADNasa al 0,1 % (Sigma) durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las células se trituraron vigorosamente y se pasaron por un filtro de 70 µm. Se recogieron las suspensiones celulares y se centrifugaron durante 10 minutos a 1600 rpm.

Se sembraron suspensiones de CMNMO, músculo o cerebro a razón de 1x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> en medio de expansión [FCS al 2 % en medio esencial mínimo de Dulbecco bajo en glucosa (LG-DMEM, por sus siglas en inglés), 10 ng/ml de cada uno de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor inhibidor de leucemia (LIF)] y se mantuvieron 5x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>. Tras 3-4 semanas, las células recuperadas con tripsina/EDTA se empobrecieron en células CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup> con perlas micromagnéticas. Las células CD45<sup>+</sup>GlyA<sup>+</sup> resultantes se sembraron nuevamente a razón de 10 células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con FN y se expandieron a densidades celulares de entre 0,5 y 1,5x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>. El potencial de expansión de las CPAM era similar, con independencia del tejido a partir del cual se habían derivado.

### EJEMPLO 3: CPAM de rata

La MO y CMN de ratas Sprague Dawley, Lewis o Wistar se obtuvieron y sembraron en placa bajo condiciones similares a las indicadas para CPAMm.

### EJEMPLO 4: Clonalidad de CPAM de ratón y rata

45 Con el fin de demostrar que las células diferenciadas se derivaban de células individuales y las CPAM eran efectivamente células multipotentes "clonales", se prepararon cultivos en los que las CPAM habían sido transducidas con un vector retroviral. Las CPAM no diferenciadas y su progenie se encontró que presentaba el retrovirus insertado en el mismo sitio del genoma.

Se llevaron a cabo estudios utilizando dos CPAM de ROSA26 derivadas independientemente, dos CPAM de C57BL/6 y una población de CPAMr expandida durante 40 a >90 duplicaciones poblacionales (DP), así como con las CPAM de ratón "clonal" transducidas con eGFP y CPAMr "clonales". No se observaron diferencias entre las células transducidas con eGFP y no transducidas. Cabe indicar que la expresión de eGFP persistió en las CPAM diferenciadas.

Específicamente, las CMNMO murinas y de rata cultivadas sobre FN con EGF, PDGF-BB y LIF durante tres semanas se transdujeron en dos días secuenciales con un vector oncoretroviral eGFP. Después, se redujo el número de células CD45<sup>+</sup> y GlyA<sup>+</sup> y las células se subcultivaron a razón de 10 células/pocillo. Las CMNMO de rata transducidas con

eGFP se expandieron durante 85 DP. Alternativamente, se utilizaron CPAM de ratón expandidas durante 80 DP. Se generaron subcultivos de CPAM no diferenciadas mediante la siembra de 100 CPAM a partir de cultivos mantenidos durante 75 DP y se reexpandieron a  $>5 \times 10^6$  células. Se indujo la diferenciación *in vitro* de las CPAM expandidas en endotelio, neuroectodermo y endodermo. Se demostró la diferenciación de linaje mediante tinción con anticuerpos específicos para dichos tipos celulares.

#### **EJEMPLO 5: Las CPAM humanas no son inmunogénicas**

Las células madre mesenquimales han demostrado una baja inmunogenicidad *in vitro* y la capacidad de injertarse en receptores alogénicos (Di Nicola, M. et al. Blood 99: 3838-3843, 2002; Jorgensen, C. et al. Gene Therapy 10: 928-931, 2002; Le Blanc, K. et al., Scandinavian Journal of Immunology 57: 11-20, 2003; McIntosh, K. et al. Graft 6: 324-328, 2000; Tse, W. et al., Transplantation 75: 389-397).

La figura 3 muestra que las CPAM humanas muestran una baja inmunogenicidad *in vitro* baja y son inmunosupresoras al añadirlas a RLM de células T de otro modo potentes. Los resultados fueron consistentes en todas las parejas de donante y respondedor sometidas a ensayo.

Se prepararon células respondedoras y estimuladoras para los presentes experimentos y se llevaron a cabo las RLM.

#### **EJEMPLO 6: las CPAM modulan las respuestas de células T**

La capacidad de las CPAM de modular y en este caso de suprimir, la capacidad de respuesta inmunitaria se ilustra mediante ensayos de proliferación de células T, por ejemplo, que pueden llevarse a cabo de la manera siguiente.

##### Preparación de células T respondedoras

Se prepararon células respondedoras a partir de ganglios linfáticos de ratas de Lewis. Se extrajeron quirúrgicamente ganglios linfáticos a partir de las ratas y se introdujeron inmediatamente en 3 a 5 ml de medio (RPMI completo o DMEM completo) en placas Petri de 60x15 mm. Los ganglios linfáticos se dispersaron a través de un filtro de nilón (utilizando el embolo manual de una jeringa). Las dispersiones se cargaron en tubos de 50 ml y se centrifugaron a 1.250 rpm durante 8 minutos. Los sobrenadantes resultantes (medios) se descartaron. Los pellets (que contenían las células) se resuspendieron en medio fresco (RPMI completo o DMEM completo). Las células se lavaron tres veces y después se resuspendieron en medio fresco. Se determinaron las densidades celulares resuspendidas mediante recuento del número de células en un volumen conocido de las mismas. Las células se mantuvieron sobre hielo. Antes de la utilización, las células se resuspendieron en medio (RPMI completo o DMEM completo) a una densidad de  $1,25 \times 10^6$  células/ml.

##### Preparación de CPAM

Las CPMA se prepararon a partir de ratas de Lewis o de Sprague-Dawley y después se congelaron tal como se ha indicado anteriormente. Se descongelaron y después se irradiaron con 3000 rad. A continuación, las células irradiadas se resuspendieron en medio (RPMI completo o DMEM completo) a densidades de  $0,4 \times 10^6$  células/ml,  $0,8 \times 10^6$  células/ml, y  $1,6 \times 10^6$  células/ml.

##### Preparación de concanavalina A

Se utiliza concanavalina A ("ConA") para activar las células T. Se disolvió ConA en PBS (RPMI completo o DMEM completo) a concentraciones finales de 0 (solo PBS), 10, 30 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

##### Procedimiento de ensayo

Cada punto de datos se basa en por lo menos tres determinaciones.

Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones de ConA a los pocillos de placas de microtitulación (96 pocillos, fondo plano), seguido de 80  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de las células respondedoras y 100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  de las CPAM. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en incubadores humidificados bajo 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 4 a 5 días. Las placas se pulsaron con 1 pCi/pocillo de  $^3\text{H}$ -timidina durante las últimas 14 a 18 horas de cultivo. Después, se recolectaron automáticamente las células sobre filtros de fibra de vidrio utilizando una maquina de recolectar Tomtec. Se cuantifico la incorporación de timidina en un contador de centelleo para microplacas. Los resultados se expresan como pulsos medios por minutos (CPM)  $\pm$  SD.

Las concentraciones finales de ConA en el medio de cultivo en los pocillos eran de 0, 1, 3, 16 y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las CPAM se encontraban presentes en los pocillos en cantidades de 0, 0,4, 0,8 y  $1,6 \times 10^5$  células/pocillo.

Los resultados, indicados posteriormente, se ilustran en la figura 4.

##### Resultados

Cantidades crecientes de ConA resultaron en una estimulación dependiente de la dosis de la proliferación de las

células T (figura 4 LN solo). Las CPAM de Lewis inhibieron la proliferación de las células T estimuladas con ConA. La inhibición dependía de la dosis de CPAM. La inhibición máxima, 50 %, se produjo a la dosis mas alta de CPAM utilizada en los presentes experimentos y con dosis bajas e intermedias de ConA. Se muestran gráficamente estos resultados en la figura 4 y muestran que las CPAM suprimen la proliferación de las células T activadas.

## 5 EJEMPLO 7: las CPAM suprimen la proliferación de las células T estimuladas

La capacidad de las CPAM de suprimir la proliferación de las respuestas proliferativas de células T singénicas y no correspondientes (alogénicas) se demuestra mediante los resultados de reacciones de linfocitos mixtos. El ejemplo posteriormente muestra los efectos supresores de las CPAM sobre las células T de ratas de Lewis estimuladas con esplenocitos irradiados de ratas DA. Las CPAM de ratas de Lewis singénicas y ratas Sprague-Dawley no compatibilizadas (alogénicas) inhibieron ambas las respuestas de células T de una manera dependiente de la dosis. Los experimentos se llevaron a cabo de la manera siguiente.

### Preparación de células T respondedoras

Se prepararon células respondedoras a partir de ganglios linfáticos de ratas de Lewis tal como se ha indicado anteriormente.

### 15 Células estimuladoras esplénicas irradiadas

A continuación, se aislaron esplenocitos a partir de bazo esencialmente tal como se ha indicado anteriormente para el aislamiento de células respondedoras de ganglios linfáticos de ratas de Lewis. Seguidamente, se aislaron esplenocitos a partir de los bazo esencialmente tal como se ha indicado anteriormente para el aislamiento de células respondedoras de ganglios linfáticos de ratas de Lewis. Las células de bazo aisladas se irradiaron a 1800 rad. A continuación, las células se resuspendieron a razón de  $4 \times 10^6$ /ml y se mantuvieron sobre hielo hasta la utilización.

### Preparación de CPAM

Se prepararon CPAM singénicas a partir de ratas de Lewis tal como se ha indicado anteriormente. Se prepararon CPAM no compatibilizadas (alogénicas) de ratas Sprague-Dawley de la misma manera. Se irradiaron CPAM de Lewis y de Sprague-Dawley a 3000 rad, después se resuspendieron en medio RPMI completo a densidades de  $0,03 \times 10^6$ /ml,  $0,06 \times 10^6$ /ml,  $0,125 \times 10^6$ /ml,  $0,25 \times 10^6$ /ml,  $0,5 \times 10^6$ /ml,  $1 \times 10^6$ /ml y  $2 \times 10^6$ /ml.

### Procedimiento de ensayo

Se cargaron pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos, con: 100 µl de CPAM (a las diluciones indicadas anteriormente) o 100 µl de medio; 50 µl de una reserva de células estimuladoras o de control; 50 µl de cada una de una reserva de células respondedoras o de control, y medio (RPMI completo o DMEM completo) Según se requiera para ecualizar los volúmenes totales a un volumen final de 200 µl/pocillo. Para todos los ensayos se utilizaron placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos.

Cada punto de datos se basa en por lo menos tres determinaciones.

Las placas se incubaron a 37°C en incubadores humidificados bajo 5 % de CO<sub>2</sub> durante 4 a 5 días. Las placas se pulsaron con 1 pCi/pocillo de <sup>3</sup>H-timidina durante las ultimas 14 a 18 horas de cultivo. Después, se recolectaron automáticamente las células sobre filtros de fibra de vidrio utilizando una maquina de recolectar Tomtec. Se cuantifico la incorporación de timidina en un contador de centelleo para microplacas. Los resultados se expresan como pulsos medios por minutos (CPM) +/- SD.

### Resultados

La exposición de las células T derivadas de ganglios linfáticos de ratas de Lewis (respondedores) a células estimuladoras que consistían en esplenocitos irradiado de ratas DA (estimadores) resulto en respuestas proliferativas muy robustas de células respondedoras, tal como se muestra en las figuras 5A y 5B para "ninguna CPAM".

La adición de dosis crecientes de CPAM de Lewis singénicas (figura 5A) y CPAM de Sprague-Dawley de tercero no compatibilizado (alogénico) (figura 5B) resulto en una inhibición significativa y dependiente de la dosis de la activación de las células T. Los niveles máximos de inhibición fueron de ~80 %. Incluso a las dosis mas bajas de CPAM, se observo una reducción de 40 % a 50 %.

No se produjo incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en los controles, mostrando que la incorporación se debía únicamente a la proliferación de células T respondedoras activadas, tal como se muestra en las figuras 5A y 5B.

En resumen, los resultados muestran que las CPAM singénicas y de tercero (alogénicas) suprimen la proliferación de las células T incluso en presencia de esplenocitos potentes activadores procedentes de ratas no compatibilizadas. En los presentes experimentos, la inhibición alcanzo un máximo al observarse un numero similar (200.000 células) de cada uno de los estimuladores, respondedores y CPAM en la reacción. Bajo estas condiciones se observo una inhibición de ~80 %. Se produjo una inhibición muy sustancial a proporciones mucho mas bajas de CPAM respecto a

las otras células en la reacción. Por ejemplo, con 1,5 % de CPAM, se produjo una inhibición de 50 % (3.000 CPAM frente a 200.000 de cada uno de los tipos de células). Los resultados demuestran que no solo las CPAM presentan un fuerte efecto inmunosupresor, sino también que un número relativamente pequeño de CPAM resulta suficiente para inhibir un número relativamente grande de células T competentes incluso en presencia de activadores muy potentes de células T.

#### **EJEMPLO 8: las CPAM son seguras**

El riesgo inmediato principal de inyección intravenosa de un gran número de células es la acumulación de agregados celulares en los pulmones, que resulta en distrés respiratorio y puede provocar parada cardíaca. Para demostrar la seguridad de las CPAM en este aspecto, los presentes inventores midieron los efectos de la inyección intravenosa de CPAM sobre las tasas respiratorias en ratas búfalo.

Se prepararon CPAM a partir de ratas de Lewis tal como se ha indicado anteriormente ("CPAM de Lewis"). También se prepararon esplenocitos a partir de ratas de Lewis tal como se ha indicado anteriormente para la utilización a modo de controles ("esplenocitos de Lewis").

Una rata de Lewis hembra sirvió de donante de esplenocitos para cada grupo (condición experimental). Se utilizaron dos ratas búfalo hembra como receptores para cada grupo (condición experimental).

Las células se administraron en las ratas tal como se indica a continuación. Los datos se muestran gráficamente en la figura 6. La concordancia de los puntos de datos con las ratas individuales Según se numeran a continuación, se muestra en la leyenda vertical a la derecha de la figura 6. Todas las ratas eran ratas búfalo.

1.1, 1.2	10 x 10 <sup>6</sup> CPAM de Lewis por rata
2.1, 2.2	5 x 10 <sup>6</sup> CPAM de Lewis por rata
3.1, 3.2	2,5 x 10 <sup>6</sup> CPAM de Lewis por rata
4.1, 4.2	1,2 x 10 <sup>6</sup> CPAM de Lewis por rata
5.1, 5.2	10 x 10 <sup>6</sup> esplenocitos de Lewis por rata
6.1, 6.2	5 x 10 <sup>6</sup> esplenocitos de Lewis por rata
7.1, 7.2	2,5 x 10 <sup>6</sup> esplenocitos de Lewis por rata
8.1, 8.2	1,2 x 10 <sup>6</sup> esplenocitos de Lewis por rata

Tal como se ha indicado anteriormente, las ratas recibieron la inyección de 1,2, 2,5, 5 o 10 millones de CPAM o 1,2, 2,5, 5 o 10 millones de esplenocitos. Lo anterior corresponde a 5, 10, 25 o 50 millones de células/kg. Se midieron las tasas respiratorias antes (0 min) y a los 1, 5 y 10 minutos de la inyección intravenosa de las CPAM o esplenocitos. Se midieron las tasas respiratorias durante 20 Segundos y se multiplicaron los recuentos por 3 para obtener las tasas respiratorias por minuto. Las tasas respiratorias de rata normales eran de entre 60 y 140/min.

#### **Resultados**

Todos los animales sobrevivieron tras las inyecciones intravenosas de células. No se observaron diferencias significativas o tendencias en las tasas respiratorias bajo las diferentes condiciones. Se muestran los resultados en la figura 6. Las tasas respiratorias iniciales (0 min) se encontraban ligeramente reducidas debido a que los animales se habían anestesiado antes de inyectar las células. En cada punto temporal, se agrupaban las mediciones sin ninguna tendencia aparente.

En resumen, la inyección intravenosa de 5 a 50 millones de CPAM/kg no provocó cambios en las tasas respiratorias o la mortalidad en ninguna de las ratas bajo ninguna de las condiciones. Los resultados muestran que la inyección intravenosa de CPAM resulta segura incluso a dosis elevadas.

#### **EJEMPLO 9: expresión en CPAM de marcadores inmunitarios**

La naturaleza inmunomoduladora de las CPAM se caracterizó adicionalmente mediante la determinación de los marcadores reguladores inmunitarios en las CPAM. Se determinaron los marcadores utilizando anticuerpos específicos de marcador y el análisis de FACS.

Se aislaron CPAM de medula ósea de rata, se cultivaron y se recolectaron tal como se ha indicado anteriormente. Para el análisis de FACS, las células se resuspendieron a razón de 1-2x10<sup>8</sup> células/ml en PBS. Se añadieron 200 µl de la suspensión celular a cada uno de una serie de 12 x 75 tubos de polipropileno. Se añadió un anticuerpo específico de marcador o un control a cada uno de los tubos y a continuación se incubaron durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Al final del periodo de incubación, se añadieron 2 ml de PBS a cada tubo y después se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en cada tubo en 100 µl de PBS. Se añadió un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente a cada tubo en un volumen apropiado y los tubos se incubaron nuevamente durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, en esta ocasión en la oscuridad. Después, se añadieron 2 ml de PBS a cada tubo y después se centrifugaron nuevamente a 400 x g durante 5 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y las células en cada tubo se resuspendieron en 200 µl de BPS y se mantuvieron

sobre hielo hasta el análisis mediante FACS.

Los resultados se enumeran y presentan gráficamente en la Tabla 1. Tal como se muestra en la tabla, las CPAM de rata son: (a) positivas para CMH de clase I, CD11c, CD29 y CD90, y (b) negativas para CMH de clase II, CD11b, CD31, CD40, CD45, CD54, CD80, CD86, CD 95 y CD 106. Se validaron resultados negativos para cada anticuerpo mediante tinción positiva de las células de control, incluyendo células de sangre periférica y endoteliales de rata. Dichos patrones de expresión de marcador, tanto respecto a los marcadores que se detectaron en las CPAM como los que no se detectaron, son totalmente consistentes con la baja sección transversal inmunoestimuladora de las CPAM.

Tabla 1. Detección de marcadores relacionados con células inmunitarias en CPAM

Marcador	Nombre/Función de marcador	Anticuerpo comercial anti- marcador de rata	Detección de FACS
CMH clase I		sí	Positivo
CMH clase II		sí	Negativo
CD11b	Mac-1	sí	Negativo
CD11c	Integrina $\alpha$ X	sí	Positivo
CD29	Integrina $\beta$ 1	sí	Positivo
CD31	PECAM-1	sí	Negativo
CD40	TNFRSF	sí	Negativo
CD45	Antígeno común leucocitario	sí	Negativo
CD54	ICAM-1	sí	Negativo
CD80	B7-1	sí	Negativo
CD86	B7-2	sí	Negativo
CD90	Thy-1	sí	Positivo
CD95	Apo-1	sí	Negativo
CD 106	VCAM-1	sí	Negativo

#### EJEMPLO 10: Las CPAM suprimen las células T anteriormente estimuladas en las RLM

##### Células

Se prepararon células respondedoras a partir de ganglios linfáticos de ratas de Lewis tal como se ha indicado anteriormente. Se utilizaron esplenocitos como estimuladores, preparados a partir de ratas búfalo o DA, tal como se ha indicado anteriormente. Se prepararon las CPAM tal como se ha indicado anteriormente.

##### Procedimientos

Se añadieron CPAM a un primer grupo de RLM simultáneamente a los esplenocitos (tal como se había llevado a cabo en los ejemplos anteriores). Además, se añadieron CPAM a un Segundo grupo de RLM que se configuraron idénticamente al primer grupo. Sin embargo, las CPAM en el Segundo grupo se añadieron 3 días después de la adición de los esplenocitos (o control). De esta manera, en el primer grupo, se añadieron CPAM antes de que las células T empezasen a proliferar en respuesta a los esplenocitos. En el Segundo grupo, se añadieron las CPAM tres días después de que la respuesta de células T a los esplenocitos se hubiese iniciado. Todas las placas se incubaron durante un total de 4 días y después se pulsaron con  $^3$ H-timidina y se recolectaron, tal como se ha indicado en los ejemplos anteriores. Los experimentos de otro modo se llevaron a cabo tal como se ha indicado para las RLM en los ejemplos anteriores.

Cada punto de datos se basa en por lo menos tres determinaciones.

##### Resultados

Tal como puede observarse en el lado derecho de la figura 7, las CPAM suprimen fuertemente la proliferación de células T en las RLM al añadirse tres días después de la estimulación por esplenocitos alogénicos. La comparación de los lados izquierdo y derecho de la figura 7 muestra que las CPAM suprimen fuertemente la reacción proliferativa que esta en marcha. Cuantitativamente, los resultados muestran para las células de búfalo que las CPAM añadidas 3 días después de la estimulación suprimieron la proliferación de las células T al 50 % en comparación con los controles (lado derecho de la figura) y al 75 % al añadirlas simultáneamente a los esplenocitos estimuladores (lado izquierdo de la figura). De manera similar, para las células de DA, las CPAM añadidas 3 días después de la estimulación suprimieron la proliferación de las células T al 33 % en comparación con los controles (lado derecho de la figura) y al 70 % al añadirlas simultáneamente a los esplenocitos estimuladores (lado izquierdo de la figura).

En todos los casos, el grado de inmunosupresión por las CPAM dependía, en general, del número de CPAM que se había añadido a la reacción. En otras palabras, la inmunosupresión dependía de la dosis de CPAM añadida a las RLM.

**EJEMPLO 11: la inhibición por CPAM de los linfocitos T es reversible**

Se cultivaron células T con estimuladores esplenocitos alogénicos durante 13 días en presencia o en ausencia de CPAM irradiadas. Tras el cultivo de 13 días, se recuperaron las células T y se sembraron nuevamente en placa con esplenocitos alogénicos irradiados, con o sin CPAM y se cultivaron durante 4 días.

- 5 La proliferación de las células T que resulto inhibida por la presencia de CPAM irradiadas durante el periodo de cultivo primario resulto restaurada en ausencia de CPAM durante el cultivo secundario. La presencia de CPAM en el cultivo secundario inhibió la proliferación de las células T comparablemente al cultivo primario, con una inhibición de hasta 90 %, con una proporción 1:2 de CPAM a células T. Los resultados, presentados en la figura 8, demuestran claramente que la inhibición de la proliferación de las células T por las CPAM en RLM es reversible, y que las CPAM inhibieron las respuestas proliferativas de células T tanto primarias como secundarias.
- 10

**EJEMPLO 12: las CPAM evitan la EICH**

La capacidad de las CPAM de suprimir la EICH se demostró en un modelo de rata de la manera siguiente. Células T procedentes de donantes rata búfalo sirvieron de "injerto" en receptores ratas Lewis x búfalo. Las células de injerto de búfalo se activaron con las células de Lewis "foráneas" en el huésped, conduciendo a una EICH en el modelo.

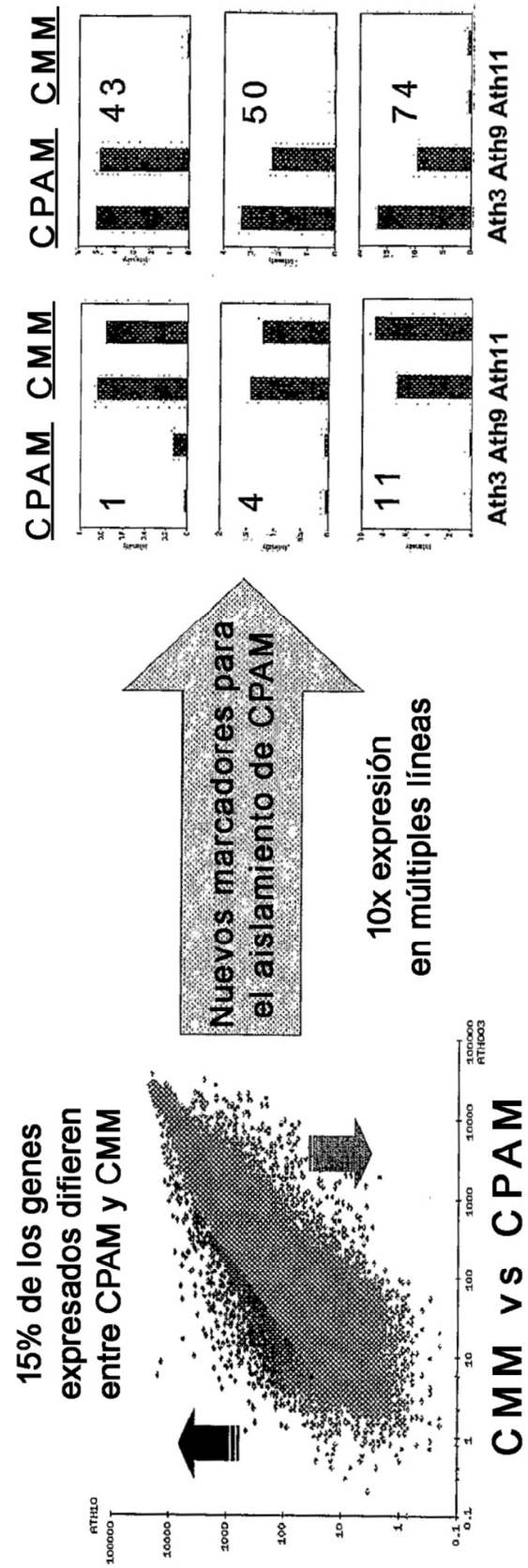
- 15 Las ratas receptoras F1 (Lewis x búfalo) se irradiaron subletalmente el día 0 con una única dosis de 600 rad. El mismo día recibieron una inyección intravenosa de  $2 \times 10^7$  células de medula ósea y  $10 \times 10^7$  células T (esplenocitos) de ratas búfalo donantes. Las ratas se monitorizaron 3x/semana para signos de EICH evaluados por la postura, actividad, textura del pelaje, piel y pérdida de peso.
- 20 El grupo 1 no recibió CPAM. El grupo 2 recibió  $2,5 \times 10^6$  CPAM el día 1. El grupo 3 recibió  $2,5 \times 10^6$  CPAM cada uno de los días 1 y 8. Había cinco ratas en cada grupo. Se muestran los resultados en la figura 9. La administración de CPAM claramente mejoro las tasas de supervivencia. El cuarenta por ciento de las ratas en el grupo 2 y el sesenta por ciento de las ratas en el grupo 3 sobrevivió hasta el final del experimento (42 días), mientras que la totalidad de las ratas que no había recibido CPAM (grupo 1) sucumbió a la EICH el día 21.

## REIVINDICACIONES

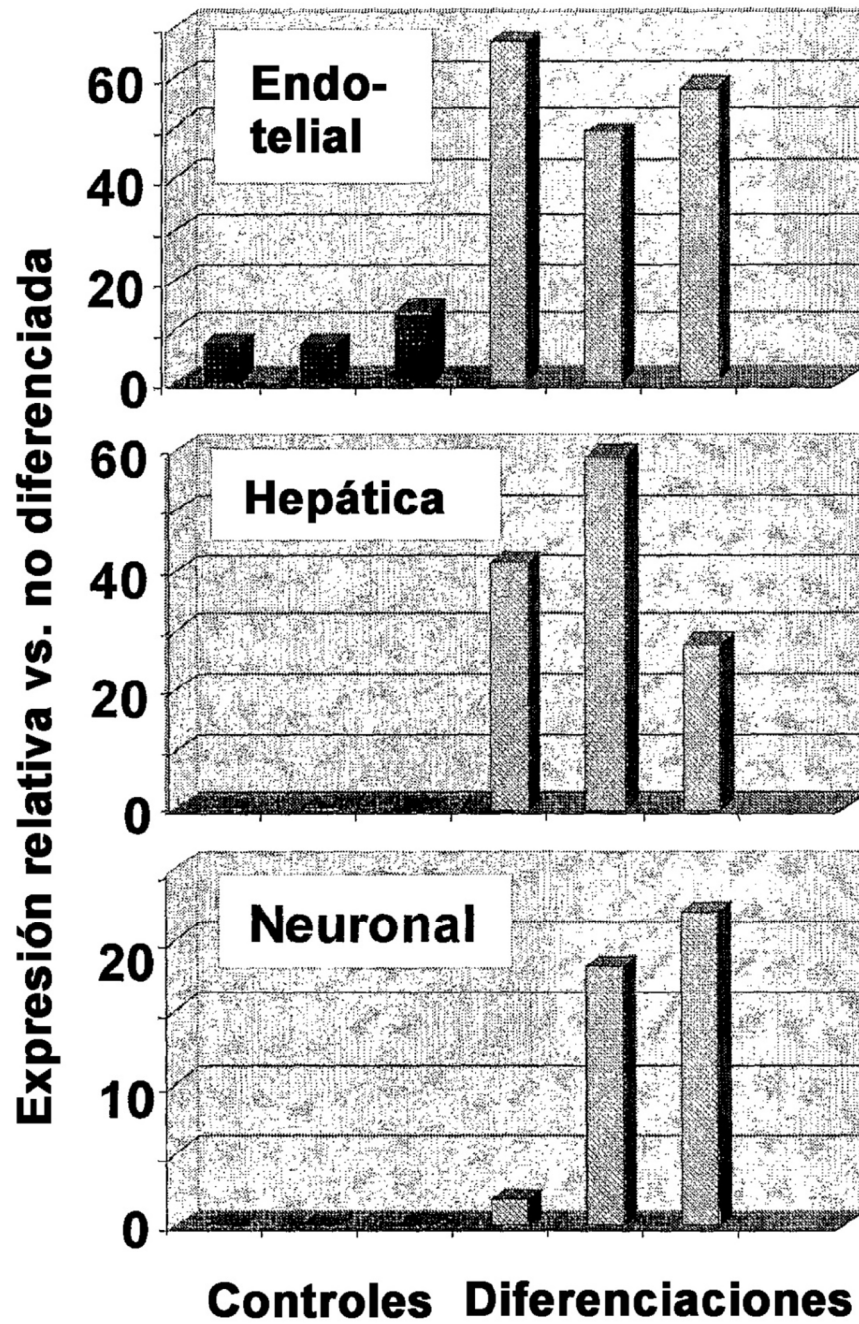
1. Células para su uso en un procedimiento de inmunosupresión en un sujeto, cuyas células son células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), caracterizadas como células madre no embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales, donde las células expresan telomerasa y expresan oct 3/4 y no provocan una respuesta inmunitaria deletérea en el sujeto, en el que las células se administran de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos.
2. Células para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en las que las células expresan rex-1, rox-1 y sox-2.
3. Células, para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en las que el potencial celular da lugar a linajes celulares de más de una capa germinal.
4. Células para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que expresan sox-2, SSEA-4 y/o nanog.
5. Células para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que dichas células son alogénicas o xenogénicas para el sujeto.
6. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que las células se derivan de tejido placentario, tejido del cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre, tejido del bazo, tejido del timo, tejido de la médula espinal, tejido adiposo o tejido hepático.
7. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que las células se derivan de la médula ósea humana.
8. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que el sujeto es un ser humano, un animal de granja, un animal de competición o un animal de compañía, por ejemplo en las que dichas células son humanas, equinas, de vaca, caprinas, ovinas, de cerdo, de rata o ratón.
9. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en las que las células han experimentado por lo menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo.
10. Células, para su uso como se reivindica en la reivindicación 9, en las que las células han experimentado por lo menos 40 duplicaciones celulares en cultivo.
11. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en las que dichas células se administran al sujeto en una o más dosis que comprenden de  $10^4$  a  $10^8$  de dichas células por kilogramo de masa del sujeto.
12. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en las que el sujeto también se trata con un agente antibiótico, un agente antifúngico, un agente antivírico y/o un agente inmunosupresor, por ejemplo, en el que el sujeto también se trata con uno o más de un corticosteroide, ciclosporina A, ciclofosfamida, globulina antitímocítica, azatioprina, rapamicina, FK-506, un agente inmunosupresor macrólido distinto de FK-506 y rapamicina.
13. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en las que las células se usan en el tratamiento adyuvante de un trastorno mieloproliferativo, un trastorno linfoproliferativo o neoplasma.
14. Células, para su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en las que la inmunosupresión es para HCl o EICH.
15. Uso de células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), caracterizadas como células que no son células madre embrionarias, células germinales embrionarias o células germinales, en el que las células expresan telomerasa y expresan oct-3/4 y no poseen una respuesta inmune deletérea en la fabricación de un medicamento para la inmunosupresión en un sujeto, en el que las células se administran de forma complementaria a uno o más de otros tratamientos.



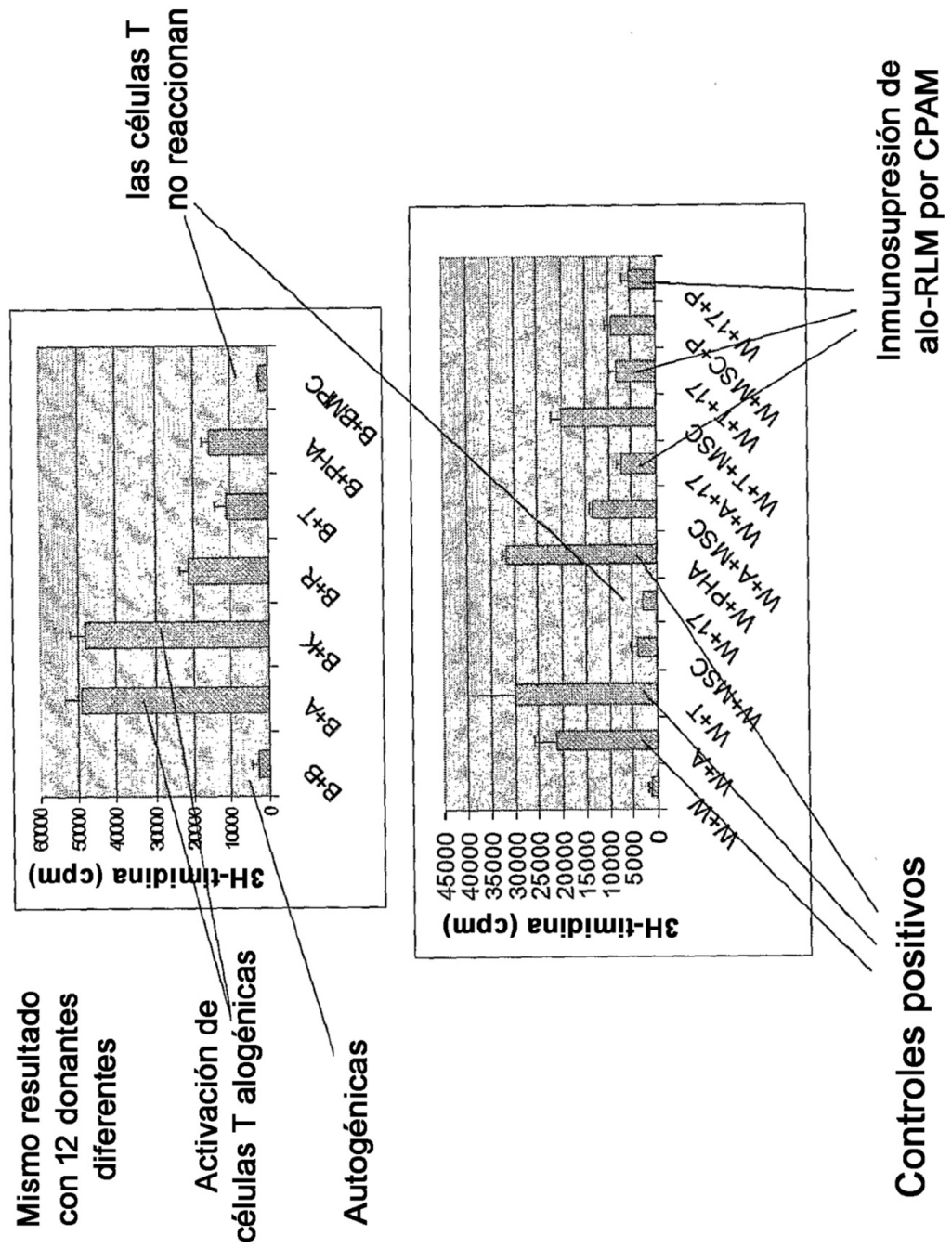
**FIGURA 1**



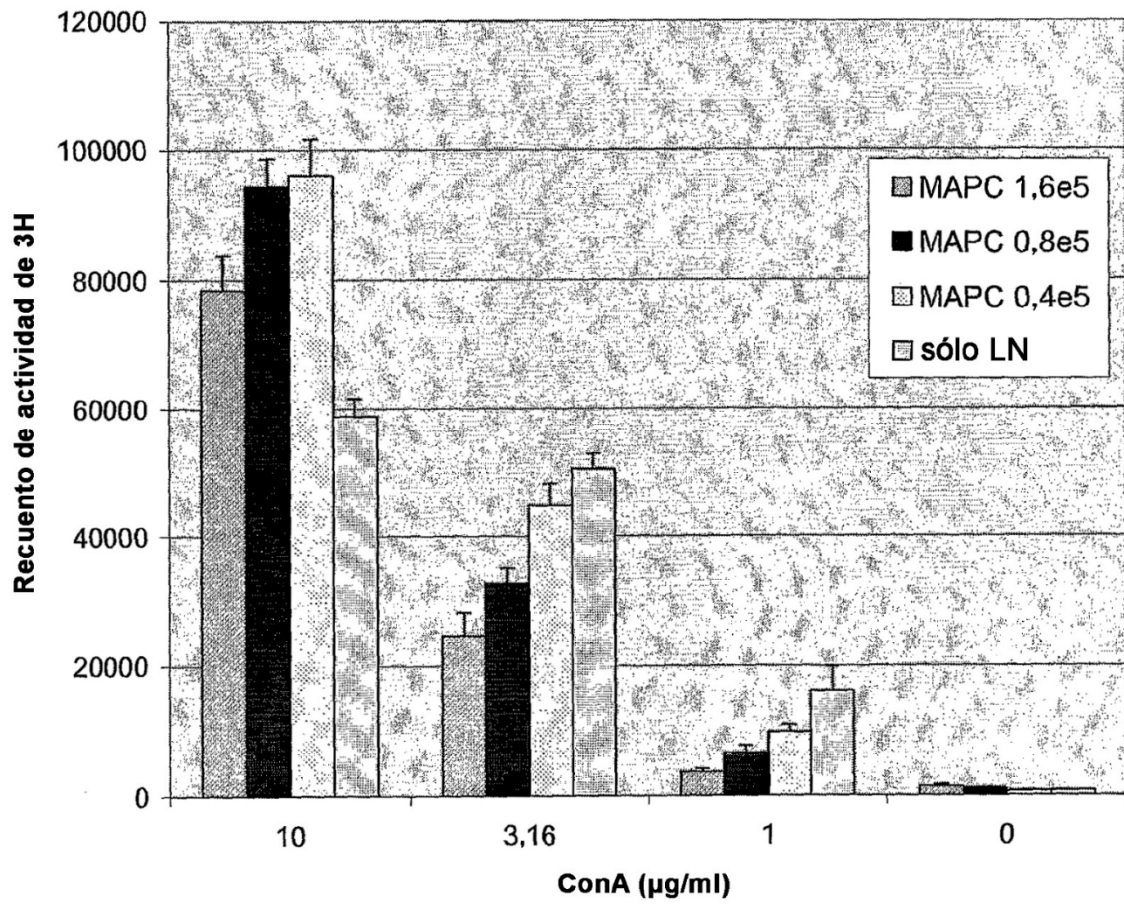
**FIGURA 2**



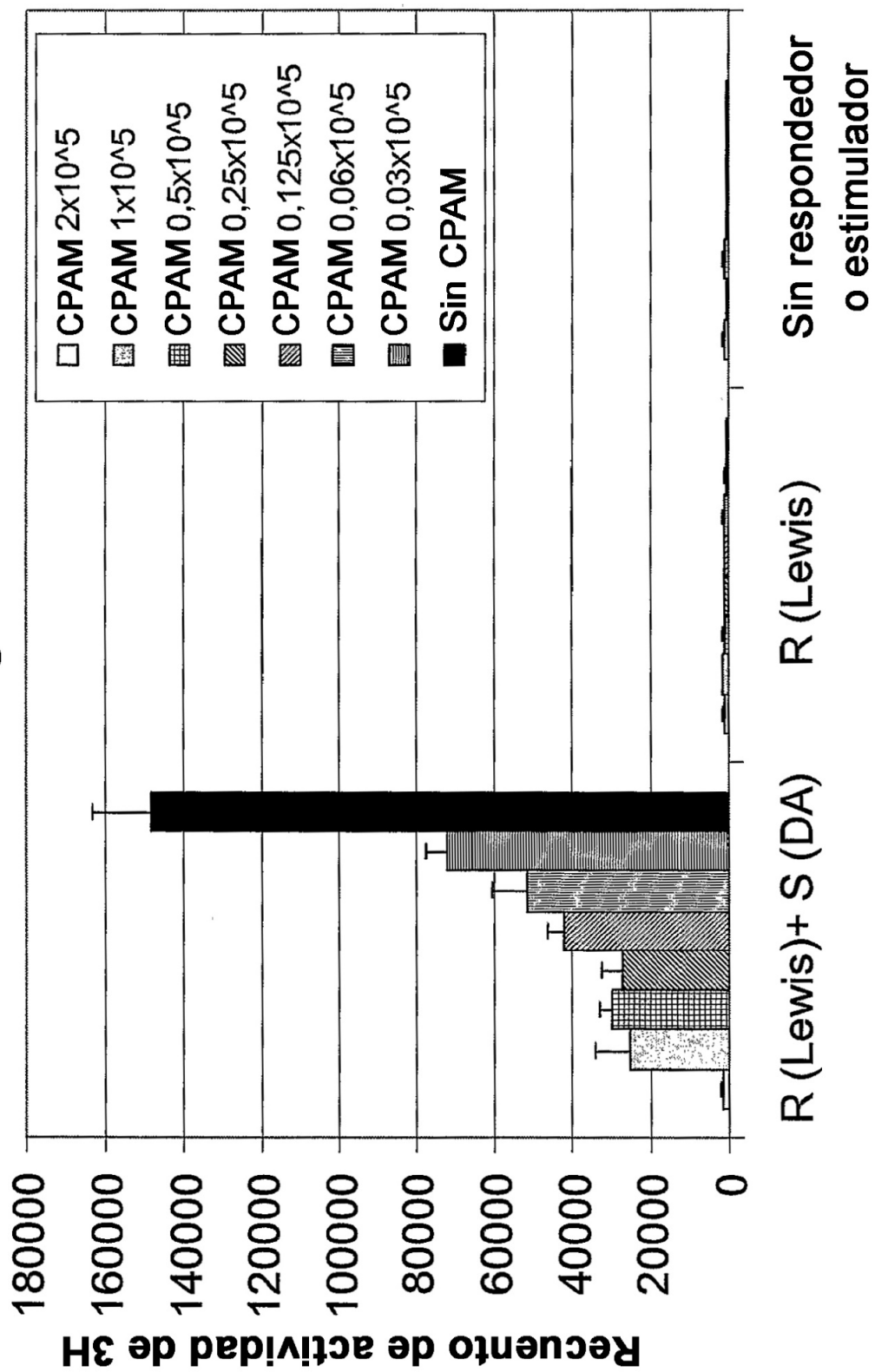
**FIGURA 3**



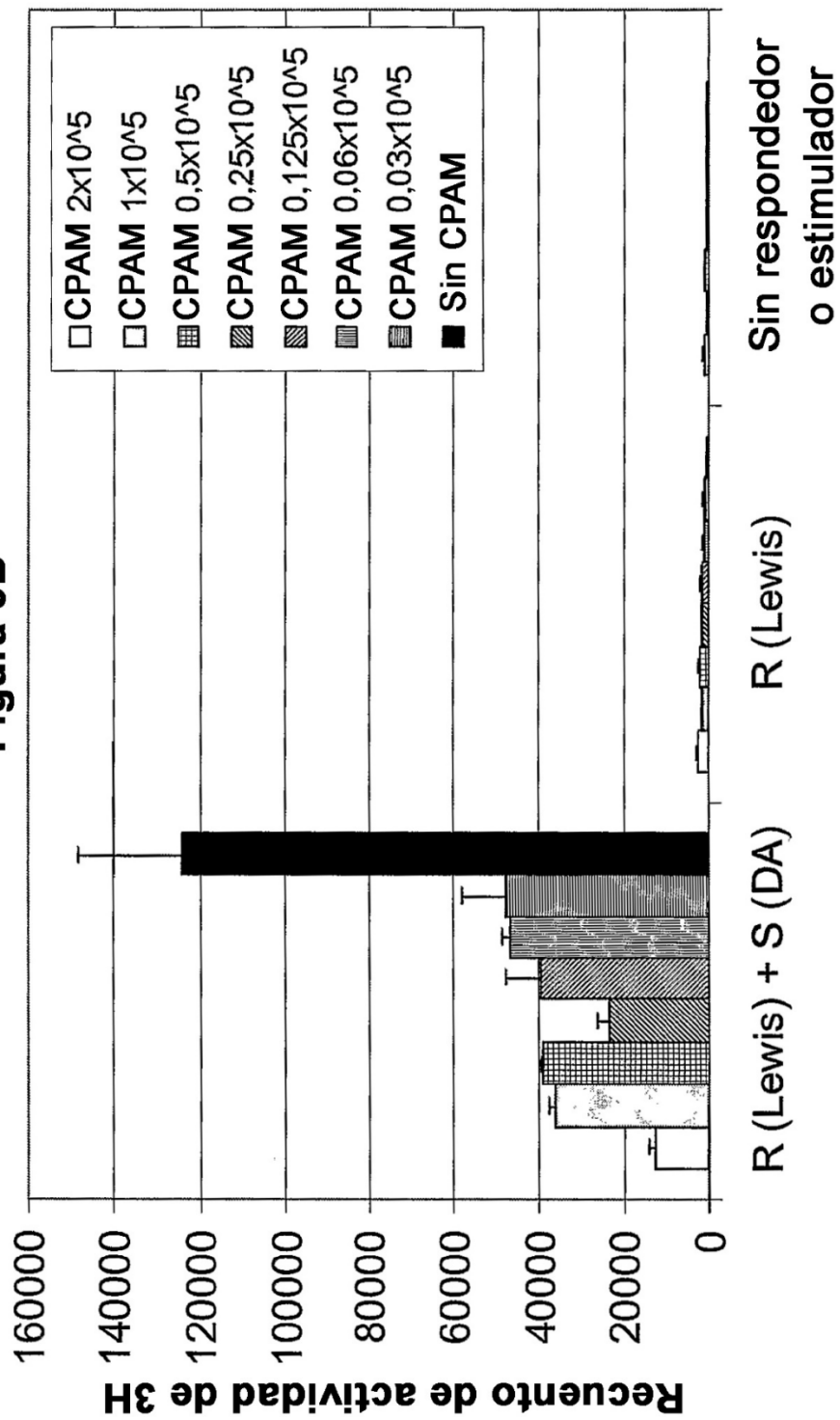
**FIGURA 4**

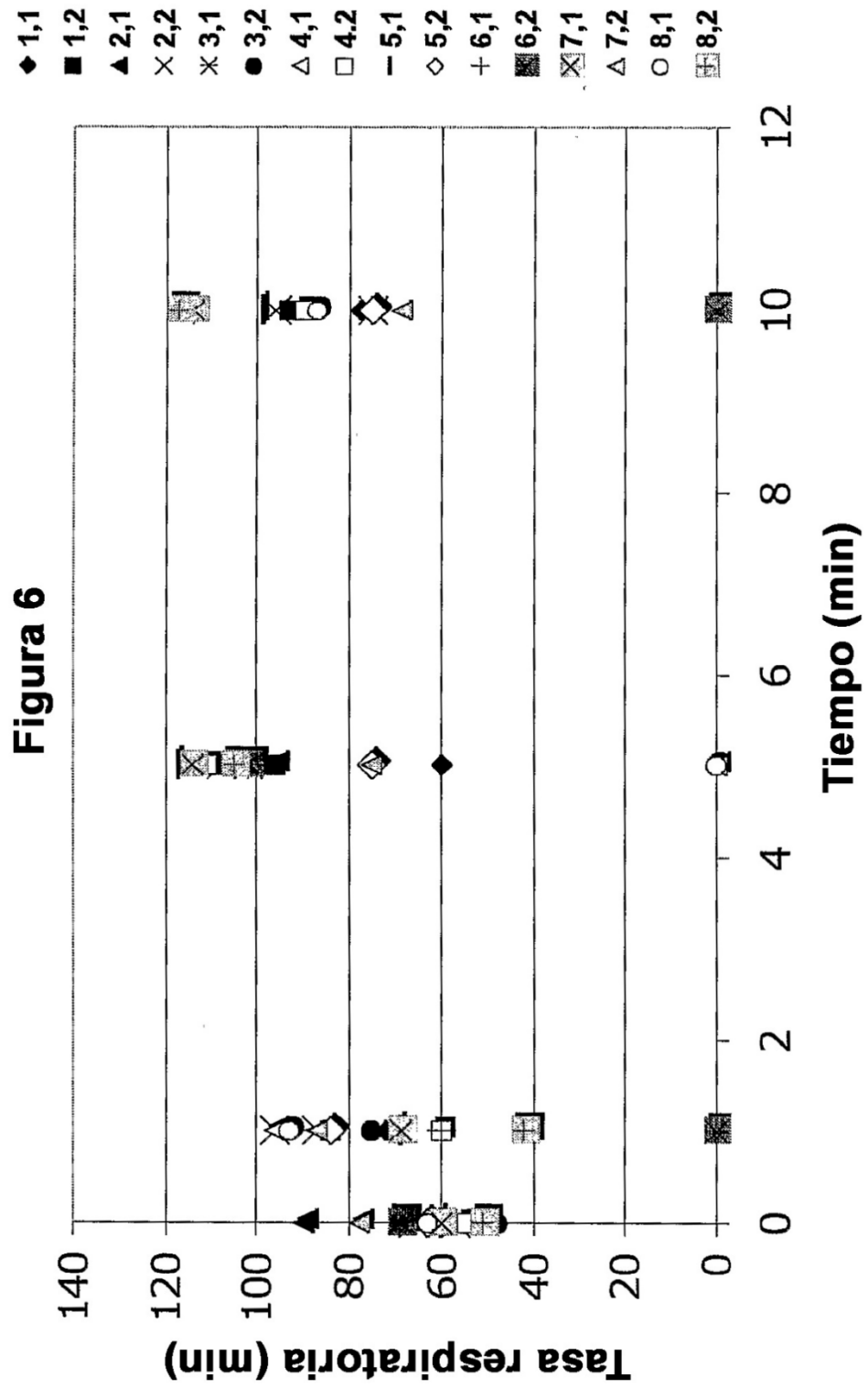


**Figura 5A**



**Figura 5B**









**Figura 8**

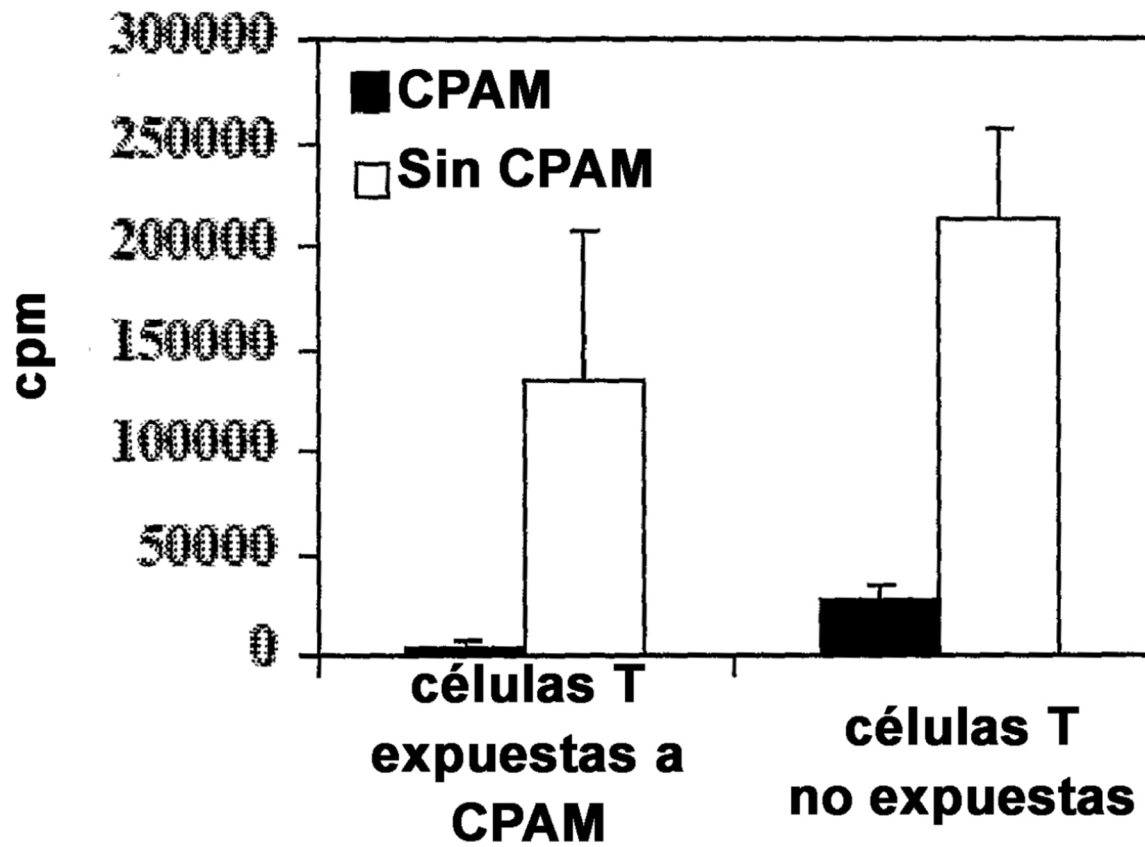


Figura 9

