

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 976**

51 Int. Cl.:

A61P 17/02	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61P 19/00	(2006.01) C12N 5/10	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01) C12N 5/0735	(2010.01)
A61P 19/04	(2006.01) C12N 5/074	(2010.01)
A61P 19/08	(2006.01) A61K 35/12	(2015.01)
A61P 19/10	(2006.01) A61K 35/28	(2015.01)
A61P 21/00	(2006.01) A61K 35/51	(2015.01)
A61P 25/00	(2006.01) C12N 5/0789	(2010.01)
A61P 25/16	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012 PCT/US2012/066987**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082243**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12854238 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 2785834**

54 Título: **Composición mejorada de células madre**

30 Prioridad:

02.12.2011 US 201161566492 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.06.2021

73 Titular/es:

**FATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
Suite 200, 3535 General Atomics Court
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHOEMAKER, DAN;
ROBBINS, DAVID;
MENDLEIN, JOHN D. y
DESPONTS, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 836 976 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

Composición mejorada de células madre

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 La invención también se refiere a métodos de preparación de células hematopoyéticas y progenitoras mejoradas y a composiciones terapéuticas que comprenden las células mejoradas.

Descripción de la técnica relacionada

15 El objetivo de la medicina regenerativa es mantener, mejorar o incluso restaurar la función de las células, tejidos y órganos dañados o enfermos. Una forma en la que la medicina regenerativa tiene como objetivo transformar la práctica de la medicina es emplear terapéuticos basados en células para tratar a los pacientes. Sin embargo, para que la promesa de terapéuticos basados en células sea completamente realizada, las células terapéuticas deben ser bien toleradas cuando se introducen en un paciente, las células también deben migrar a o "alojarse" en sitios donde se necesita la terapia, y las células deben ser capaces de proporcionar la terapia deseada. La técnica ha intentado
20 emplear terapéuticos basados en células madre y células progenitoras, pero ha tenido poco o ningún éxito en un ámbito clínico humano.

25 Un área de la medicina regenerativa que se beneficiaría de los terapéuticos basados en células mejorados son los trasplantes de células madres, por ejemplo, trasplantes de médula ósea y trasplantes de células madre hematopoyéticas para tratar diversas enfermedades genéticas, cánceres y trastornos degenerativos. Según el Programa Nacional de Donantes de Médula Ósea® (NMDP), se realizan anualmente en todo el mundo una estimación de 45.000 a 50.000 trasplantes de células hematopoyéticas para tratar pacientes con enfermedades malignas y no malignas posiblemente mortales. Sin embargo, el trasplante de médula ósea tiene numerosos inconvenientes: la donación de médula ósea es dolorosa, a veces es difícil y requiere tiempo, y frecuentemente no
30 es posible encontrar tejido de donante de HLA compatible; y los trasplantes alógenos están asociados con una incidencia significativa de enfermedad injerto contra huésped (EICH). Además, aunque se han realizado trasplantes de células madres hematopoyéticas alógenas usando sangre del cordón umbilical más fácilmente obtenible, los trasplantes de sangre del cordón umbilical todavía tienen un riesgo de EICH. Otros inconvenientes a los métodos existentes de trasplantes de sangre del cordón incluyen menos números de células trasplantables y alojamiento e injerto deficientes de las células del donante, ambos de los cuales ponen al paciente en un alto riesgo de infecciones potencialmente mortales. Además, los trasplantes de sangre del cordón tienen, en general, todos los mismos riesgos que los trasplantes de médula ósea y de sangre periférica.

35 Se han probado numerosos enfoques para ampliar el número de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas en la sangre del cordón dentro de injertos aislados en entornos *ex vivo*, para reducir la incidencia de EICH, o para aumentar la capacidad de las células para el alojamiento e injerto, pero estos esfuerzos han tenido un éxito limitado. En este contexto, el documento de patente WO 2010/054271 A1 desvela que el tratamiento *ex vivo* de HSPC con una cantidad eficaz de PGE₂, o al menos uno de sus derivados tales como 16,16-dimetil prostaglandina E₂ (dmPGE₂), promueve el injerto de HSPC. Kahn et al. (BLOOD, vol. 103, no. 8, páginas 2942-1949, 2004)
45 desvelan que la expresión en exceso de CXCR4 en progenitores CD34⁺ humanos aumenta su proliferación, migración y promueve el injerto *in vivo* en ratones NOD/SCID.

50 Otra área de la medicina regenerativa que se beneficiaría de terapéuticos mejorados basados en células es el tratamiento de tejido dañado por isquemia. La interrupción de la circulación sanguínea hacia los tejidos y los órganos se conoce como isquemia. La viabilidad de las células, los tejidos y los órganos en el cuerpo humano depende de una circulación sanguínea suficiente. La circulación sanguínea suficiente proporciona a las células oxígeno, glucosa y los muy necesarios nutrientes que son importantes para la regulación de la fisiología celular y el metabolismo. La isquemia puede ser aguda o crónica. Tanto las formas agudas como crónicas de la isquemia dan como resultado la pérdida de nutrientes suficientes a las células, y si se prolonga, dará como resultado condiciones hipóxicas y/o
55 anóxicas. Si la isquemia se deja sin tratar, las células pueden experimentar necrosis o apoptosis, poniéndose así en peligro la integridad y la salud del tejido u órgano.

60 La isquemia afecta a millones de pacientes en los Estados Unidos cada año. La isquemia se provoca por una variedad prácticamente ilimitada de afecciones genéticas, agresiones medioambientales, lesión traumática o intervenciones quirúrgicas. Los tipos más comunes de pacientes con isquemia padecen incluyen, pero no se limitan a, isquemias cerebrales, lesiones de la médula espinal, isquemias cardiovasculares, isquemias de las extremidades, isquemias intestinales, isquemias dérmicas (por ejemplo, quemaduras y heridas por congelación) e isquemias resultantes de procedimientos médicos y quirúrgicos, que incluyen, pero no se limitan a, trasplantes de órganos e injertos de piel.

65 Actualmente, la resolución de la isquemia aguda y crónica requiere la restauración de la perfusión del tejido y la

circulación sanguínea usando frecuentemente medios quirúrgicos, que pone además a los pacientes en riesgo de daño al tejido isquémico. La restauración de la circulación sanguínea después de un periodo de isquemia puede ser realmente más dañina que la isquemia. La reintroducción de oxígeno provoca una mayor producción de radicales libres dañinos, así como permite, mediante la retirada de las condiciones ácidas extracelulares, la entrada de calcio y así la sobrecarga de calcio. En general, esto da como resultado la lesión por reperfusión que puede dar como resultado arritmias cardíacas posiblemente mortales, también se puede acelerar enormemente la necrosis. Otros tratamientos existentes que tratan el tejido isquémico incluyen oxígeno hiperbárico, trombolíticos intravenosos, agentes antiinflamatorios y administración local de promotores de la angiogénesis. Sin embargo, estos tratamientos han tenido, en general, un éxito limitado, si lo han tenido.

Así, muchas de las composiciones y materiales basados en células usados en la medicina regenerativa son actualmente de precio prohibitivo, ineficientes y/o inseguros. Otras limitaciones significativas del uso de terapéuticos basados en células madre y en células progenitoras en la medicina regenerativa son la ausencia de tecnologías disponibles para controlar la proliferación de células madre, movilidad, o para dirigir la célula madre, por ejemplo, alojamiento, al nicho o tejido particular donde se necesita la terapia. El resultado final es que los terapéuticos basados en células no se consideran una opción de tratamiento realista para aquellos en necesidad de medicina regenerativa.

Por consiguiente, existe una necesidad sustancial en la técnica de terapéuticos mejorados basados en células que sean expansibles, que sean capaces de alojarse en sitios en el paciente donde se desea la terapia, y que sean capaces de proporcionar un beneficio terapéutico persistente. La presente invención trata estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La invención proporciona, en general, un método de preparación de composiciones basadas en células novedosas con propiedades terapéuticas mejoradas como se define en las reivindicaciones. Se desvela una célula madre o progenitora hematopoyética humana que comprende una célula madre o progenitora hematopoyética contactada *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en la célula madre o progenitora hematopoyética con la que se ha puesto en contacto en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

El uno o más agentes comprenden opcionalmente (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina; y (ii) uno o más glucocorticoides.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente al receptor de PGE₂ EP₂ o PGE₂ EP₄.

El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.

El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorcortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteptrato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

El glucocorticoide es opcionalmente medrisona.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente veinticuatro horas.

5 Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente doce horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas.

10 Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.

15 La célula se obtiene opcionalmente de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal.

20 También se desvela una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión de CXCR4 en las células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

25 El uno o más agentes comprenden opcionalmente (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides.

30 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 40 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

35 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 50 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

40 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 60 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

45 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 70 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

50 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 80 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

55 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

60 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 80 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

65 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente aproximadamente 60 a aproximadamente 80 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas comprenden opcionalmente un distintivo de expresión génica en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70 o aproximadamente 80 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas y en donde la expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de

progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células no contactadas y en donde la expresión génica de tres o más genes seleccionados del grupo que consiste en: HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 aumenta en al menos aproximadamente dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células no contactadas.

5 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas comprenden opcionalmente un distintivo de expresión génica en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células no contactadas y en donde la expresión génica de tres o más genes seleccionados del grupo que consiste en: HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 aumenta en al menos aproximadamente tres veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células no contactadas.

15 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas comprenden opcionalmente un distintivo de expresión génica en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células no contactadas y en donde la expresión génica de tres o más genes seleccionados del grupo que consiste en: HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 aumenta en al menos aproximadamente cinco veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células no contactadas.

20 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas comprenden opcionalmente un distintivo de expresión génica en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células no contactadas y en donde la expresión génica de tres o más genes seleccionados del grupo que consiste en: HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 aumenta en al menos aproximadamente diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células no contactadas.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

30 El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo de PGE₂ o derivado del mismo.

35 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.

El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, clobetasol, propionato, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, difluorcortolona, valerato de difluorcortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, 45 fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicartrato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasonol.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora con al menos uno de (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina o 55 (ii) uno o más glucocorticoides.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente veinticuatro horas con al menos uno de (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides.

60 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas con al menos uno de (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides.

65 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto durante un tiempo de aproximadamente cuatro horas con al menos uno de (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno

o más glucocorticoides.

La población de células comprende opcionalmente inferior a aproximadamente 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20 o 30 % de células CD34⁺.

5 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 0,01 % y no más de aproximadamente 50 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 1 % de células CD34⁺.

10 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 3 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 5 % de células CD34⁺.

15 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 10 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 20 % de células CD34⁺.

20 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 30 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 40 % de células CD34⁺.

25 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 50 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 60 % de células CD34⁺.

30 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 70 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 80 % de células CD34⁺.

35 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 90 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 95 % de células CD34⁺.

40 La población de células no se expande opcionalmente *ex vivo*.

La composición se genera opcionalmente a un análisis de diagnóstico inmediato y se administra a un paciente sin cultivar la población de células.

45 La composición se lava opcionalmente y está sustancialmente libre del uno o más agentes.

La población de células se obtiene opcionalmente de médula ósea, hígado fetal, sangre fetal, placenta, sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada.

50 La presente invención contempla, en parte, un método de preparación de una célula madre o progenitora hematopoyética humana comprendiendo el método poner en contacto la célula madre o progenitora hematopoyética *ex vivo* con un agente que comprende uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina y uno o más glucocorticoides; en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en la(s) célula(s) madre o progenitora(s) hematopoyética(s) contactada(s) en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

En una cierta realización particular, el agonista del receptor de la prostaglandina comprende un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

55 En una realización particular adicional, el agonista del receptor de la prostaglandina se selecciona del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

En otra realización particular, el agonista del receptor de la prostaglandina comprende PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

60 En una realización particular adicional, el agonista del receptor de la prostaglandina comprende 16,16-dimetil PGE₂.

65 En una cierta realización, el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida,

desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorcortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buterato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetazol.

En una cierta realización adicional, el glucocorticoide es medrisona.

En una cierta realización adicional, las células madre o progenitoras se han puesto en contacto con al menos un agente durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.

En otra cierta realización, la célula madre o progenitora hematopoyética se ha puesto en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente veinticuatro horas.

En otra cierta realización, las células madre o progenitoras se han puesto en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas.

En una cierta realización particular, las células madre o progenitoras se han puesto en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.

En una realización adicional, las células madre o progenitoras se han puesto en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.

En otra realización adicional, la célula se obtiene de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal.

También se desvela un método de preparación de una composición terapéutica que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas, comprendiendo el método poner en contacto células madre o progenitoras hematopoyéticas *ex vivo* con un agente que comprende (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides; en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

En una realización particular, la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 40 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

En una cierta realización particular, el agonista de la vía de la prostaglandina comprende un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

En una realización particular adicional, el agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

En otra realización particular, el agonista de la vía de la prostaglandina comprende PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

En una realización particular adicional, el agonista de la vía de la prostaglandina comprende 16,16-dimetil PGE₂.

En una cierta realización, el glucocorticoide se selecciona del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorcortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buterato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona,

prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

En una cierta realización adicional, el glucocorticoide es medrisona.

- 5 En una realización particular, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.
- 10 En una realización particular adicional, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente veinticuatro horas.
- 15 En una realización particular adicional, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente doce horas.
- 20 En una realización particular adicional, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.
- 25 En una realización particular adicional, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.
- 30 En otra realización particular, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente cuatro horas.
- 30 En una cierta realización, la población de células comprende menos de aproximadamente 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20 o 30 % de células CD34⁺.
- 35 En una realización adicional, la población de células comprende al menos aproximadamente 0,01 % y no más de aproximadamente 50 % de células CD34⁺.
- 35 En otra realización, la población de células comprende al menos aproximadamente 1 % de células CD34⁺.
- En una realización adicional, la población de células comprende al menos aproximadamente 3 % de células CD34⁺.
- 40 En una realización particular, la población de células comprende al menos aproximadamente 5 % de células CD34⁺.
- 40 En otra realización particular, la población de células comprende al menos aproximadamente 10 % de células CD34⁺.
- 45 En otra realización particular más, la población de células comprende al menos aproximadamente 20 % de células CD34⁺.
- 45 En aún otra realización particular más, la población de células comprende al menos aproximadamente 30 % de células CD34⁺.
- 50 En una cierta realización, la población de células comprende al menos aproximadamente 40 % de células CD34⁺.
- En otra cierta realización, la población de células comprende al menos aproximadamente 50 % de células CD34⁺.
- 55 En otra cierta realización más, la población de células comprende al menos aproximadamente 60 % de células CD34⁺.
- 55 En aún otra cierta realización más, la población de células comprende al menos aproximadamente 70 % de células CD34⁺.
- 60 En una realización adicional, la población de células comprende al menos aproximadamente 80 % de células CD34⁺. En otra realización adicional, la población de células comprende al menos aproximadamente 90 % de células CD34⁺.
- 65 En otra realización adicional más, la población de células comprende al menos aproximadamente 95 % de células CD34⁺.
- 65 En una realización adicional, la población de células no se expande *ex vivo*. En una cierta realización, la

composición genera un análisis de diagnóstico inmediato y la célula o células no se cultivan.

En una realización adicional, la composición se lava y está sustancialmente libre del uno o más agentes.

5 En otra realización, la población de células se obtiene de médula ósea, hígado fetal, sangre fetal, placenta, sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada.

10 Se desvelan células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de terapia celular que comprende administrar al sujeto células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión de CXCR4 en las células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

15 El sujeto tiene opcionalmente leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), aplasia eritrocítica pura, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, drepanocitosis, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mieloide agnógena, linfocitosis eritrofagocítica familiar, tumores sólidos, enfermedad granulomatosa crónica, mucopolisacaridosis o Diamond-Blackfan.

20 El sujeto tiene opcionalmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático o sarcoma.

El sujeto ha recibido opcionalmente quimioterapia o radioterapia ablativa de la médula ósea o no mieloablativa.

30 El sujeto es opcionalmente un donante de médula ósea.

El sujeto tiene opcionalmente un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia.

35 El sujeto tiene opcionalmente al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia.

La isquemia se asocia opcionalmente a síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome disneico agudo (SDA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto del cartílago articular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura de hueso, fractura de hueso, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger, quemaduras, 40 cáncer, enfermedad cardiovascular, daño al cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño al tejido conjuntivo, contusión, enfermedades de las arterias coronarias (EAC), isquemia crítica de las extremidades (CLI), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, curación retardada de úlceras, curación retardada de heridas, diabetes 45 (tipo I y tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, enfermedad injerto contra huésped, telangiectasia hemorrágica hereditaria, enfermedad vascular isquémica, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión isquémica-por reperfusión, laceración, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia orgánica, osteoartritis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad de las arterias periféricas, isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, pre-cáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de la remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, septicemia, úlceras de la piel, trasplante de órganos sólidos, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, quiste subcondral del hueso, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia de tejido, ataque isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular del riñón, afecciones inflamatorias vasculares, síndrome de von Hippel-Lindau y heridas en tejidos u órganos.

60 También se desvela una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas para su uso en un método de aumento del alojamiento y/o injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células; y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos 65

aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

5 El uno o más agentes comprenden opcionalmente (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina; y (ii) uno o más glucocorticoides.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

10 El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

15 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.

El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, difluorcortolona, valerato de difluorcortolona, difluorocortolona, difluprednato, flucclorolona, acetónido de flucclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6α-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicartrato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

30 El glucocorticoide es opcionalmente medrisona.

35 Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.

La célula madre o progenitora hematopoyética se ha puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente veinticuatro horas.

40 Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.

45 Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.

50 La célula se obtiene opcionalmente de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal.

También se desvela una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas para su uso en un método de aumento del alojamiento y/o injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto *ex vivo* con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides; y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

60 La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 40 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

65 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

ES 2 836 976 T3

El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

5 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.

10 El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6α-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicartrato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

25 El glucocorticoide es opcionalmente medrisona.

Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.

30 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.

35 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.

40 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente cuatro horas.

La población de células comprende opcionalmente menos de aproximadamente 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20 o 30 % de células CD34⁺.

45 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 0,01 % y no más de aproximadamente 50 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 1 % de células CD34⁺.

50 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 3 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 5 % de células CD34⁺.

55 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 10 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 20 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 30 % de células CD34⁺.

60 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 40 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 50 % de células CD34⁺.

65 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 60 % de células CD34⁺.

La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 70 % de células CD34⁺.

- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 80 % de células CD34⁺.
- 5 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 90 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 95 % de células CD34⁺.
- La población de células no se expande opcionalmente *ex vivo*.
- 10 La composición genera opcionalmente un análisis de diagnóstico inmediato y se administra en un paciente sin cultivar la población de células.
- La composición se lava opcionalmente y está sustancialmente libre del uno o más agentes.
- 15 La población de células se obtiene opcionalmente de médula ósea, hígado fetal, sangre fetal, placenta, sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada.
- 20 El sujeto tiene opcionalmente leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), aplasia eritrocítica pura, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, drepanocitosis, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mioide agnogénica, linfohistiocitosis eritrofagocítica familiar o tumores sólidos.
- 25 El sujeto tiene opcionalmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, o sarcoma.
- 30 El sujeto ha recibido opcionalmente quimioterapia o radioterapia ablativa de la médula ósea o no mieloablativa.
- El sujeto es opcionalmente un donante de médula ósea.
- La población de células es opcionalmente autógena para el sujeto.
- 35 La población de células se moviliza opcionalmente desde la sangre periférica o médula ósea del sujeto.
- La población de células es opcionalmente alógena para el sujeto.
- 40 También se desvela en el contexto de la presente invención una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas para su uso en un método de aumento de la reconstitución de células madre y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde la célula madre o progenitora hematopoyética se ha puesto en contacto *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células; y la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en la célula madre o progenitora hematopoyética contactada en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.
- 45 El uno o más agentes comprenden opcionalmente (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina; y (ii) uno o más glucocorticoides.
- 50 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.
- El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.
- 55 El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.
- El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.
- 60 El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludrocortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona,
- 65

fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6α-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetazol.

El glucocorticoide es opcionalmente medrisona.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.

La célula madre o progenitora hematopoyética se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente veinticuatro horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.

Las células madre o progenitoras se han puesto opcionalmente en contacto con al menos un agente durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.

La célula se obtiene opcionalmente de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal.

También se desvela una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas para su uso en un método de aumento de la reconstitución de células madre y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una población de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas humanas en donde las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto en contacto *ex vivo* con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides; y b) la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

La expresión génica de CXCR4 aumenta opcionalmente al menos aproximadamente 40 veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas contactadas en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

El agonista de la vía de la prostaglandina se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂.

El agonista de la vía de la prostaglandina comprende opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂.

El glucocorticoide se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorcortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6α-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetazol.

El glucocorticoide es opcionalmente medrisona.

- Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de al menos aproximadamente una hora.
- 5 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas.
- 10 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.
- 15 Las células madre o progenitoras hematopoyéticas se han puesto opcionalmente en contacto con (i) uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y (ii) uno o más glucocorticoides durante un tiempo de aproximadamente cuatro horas.
- 20 La población de células comprende opcionalmente menos de aproximadamente 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20 o 30 % de células CD34⁺.
- 25 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 0,01 % y no más de aproximadamente 50 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 1 % de células CD34⁺.
- 30 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 3 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 5 % de células CD34⁺.
- 35 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 10 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 20 % de células CD34⁺.
- 40 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 30 % de células CD34⁺.
- 45 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 40 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 50 % de células CD34⁺.
- 50 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 60 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 70 % de células CD34⁺.
- 55 La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 80 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 90 % de células CD34⁺.
- La población de células comprende opcionalmente al menos aproximadamente 95 % de células CD34⁺.
- 60 La población de células no se expande opcionalmente *ex vivo*.
- La composición genera opcionalmente un análisis de diagnóstico inmediato y se administra en un paciente sin cultivar la población de células.
- 65 La composición se lava opcionalmente y está sustancialmente libre del uno o más agentes.
- La población de células se obtiene de médula ósea, hígado fetal, sangre fetal, placenta, sangre placentaria, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada.
- 60 La población de células comprende opcionalmente una o más unidades de sangre del cordón.
- El sujeto tiene opcionalmente leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), aplasia eritrocítica pura, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SICS), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, drepanocitosis,

síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mieloide agnogénica, linfohistiocitosis eritrofagocítica familiar o tumores sólidos.

5 El sujeto tiene opcionalmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático o sarcoma.

El sujeto ha recibido opcionalmente quimioterapia o radioterapia ablativa de la médula ósea o no mieloablativa.

10 El sujeto es opcionalmente un donante de médula ósea.

La población de células es opcionalmente autógena para el sujeto.

La población de células se moviliza opcionalmente desde la sangre periférica o médula ósea del sujeto

15 La población de células es opcionalmente alógena para el sujeto.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

20 La **Figura 1** muestra el aumento en los niveles de ARNm de CXCR4 detectado (con respecto al tratamiento con vehículo) en células CD34⁺ de sangre del cordón humano cuando las células se tratan con o 10 µM de un agente individual o con una combinación de dmPGE₂ 10 µM y 10 µM de uno de los cinco glucocorticoides diferentes. Los glucocorticoides actúan sinérgicamente con dmPGE₂ aumentando la expresión génica de CXCR4.

25 Las **Figuras 2A - 2C** muestran el aumento en ARNm de CXCR4 detectado en células CD34⁺ de sangre del cordón humano cuando las células CD34⁺ se tratan con: PGE₂ sola o una combinación de PGE₂ con diversos glucocorticoides (Fig. 2A); 15(S)-15-metil PGE₂ (mPGE₂) sola o en combinación con diversos glucocorticoides (Fig. 2B); o 20-etil PGE₂ (ePGE₂) sola o en combinación con diversos glucocorticoides (Fig. 2C). Los datos muestran que los glucocorticoides actúan sinérgicamente con los agonistas de la vía de la prostaglandina para aumentar la expresión génica de CXCR4 en células CD34⁺.

30 La **Figura 3** muestra el aumento en ARNm de CXCR4 detectado en células CD34⁺ humanas derivadas de sangre del cordón o sangre periférica movilizada (SPm) cuando las células CD34⁺ se tratan con o un agonista de la vía de la prostaglandina sola o en combinación con un glucocorticoide. Las células CD34⁺ responden similarmente al tratamiento independientemente de la fuente de origen de las células CD34⁺.

35 Las **Figuras 4A - 4B** muestran el aumento en el número de células CD34⁺ que expresan la proteína CXCR4 de la superficie (Fig. 4A), representado como % de CXCR4⁺, y el aumento en la cantidad de proteína CXCR4 de la superficie de las células CD34⁺ (Fig. 4B) medido en intensidad fluorescente media (IFM) después de que las células CD34⁺ se traten con o un agonista de la vía de la prostaglandina solo o en combinación con un glucocorticoide.

40 La **Figura 5** muestra la medición cinética del aumento en ARNm de CXCR4 detectado (cambio en veces) y el número de células CD34⁺ humanas que expresan la proteína de la superficie CXCR4 (% de células CXCR4⁺) durante un tratamiento de 2 horas y durante 4 horas adicionales después de la retirada del tratamiento (medio solo) después de que las células CD34⁺ se traten con o un agonista de la vía de la prostaglandina sola o en combinación con un glucocorticoide.

45 La **Figura 6** muestra la medición cinética del aumento en ARNm de CXCR4 detectado (cambio en veces) y el número de células CD34⁺ humanas que expresan la proteína de la superficie CXCR4 (% de células CXCR4⁺) durante un tratamiento de 4 horas y durante 4 horas adicionales después de la retirada del tratamiento (medio solo) después de que las células CD34⁺ se traten con o un agonista de la vía de la prostaglandina sola o en combinación con un glucocorticoide.

50 La **Figura 7** muestra los resultados de un ensayo de migración Transwell de SDF-1 representativo. Los resultados muestran el efecto de tratar células CD34⁺ con control de DMSO, dmPGE₂, o dmPGE₂ y medrisona sobre la eficiencia de la migración celular hacia SDF-1. Los datos demuestran la capacidad mejorada de las células CD34⁺ tratadas con una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide para migrar a un gradiente de SDF-1 en comparación con las células CD34⁺ tratadas con vehículo o un agonista de la vía de la prostaglandina solo. Los resultados indican que el aumento en la expresión génica de CXCR4 en células tratadas con la combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide se traduce en un aumento en la capacidad funcional.

55 La **Figura 8** muestra la eficiencia de la migración celular hacia SDF-1 de células CD34⁺ tratadas con dmPGE₂ sola o en combinación con diversos glucocorticoides. Las células CD34⁺ tratadas con la combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide muestran una elevada capacidad para migrar hacia un gradiente de SDF-1 en comparación con las células CD34⁺ tratadas con vehículo o un agonista de la vía de la prostaglandina solo.

60 La **Figura 9** muestra la duración de la capacidad de migración mejorada de células CD34⁺ tratadas con una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide. Los resultados demuestran que la duración de la capacidad de migración mejorada se mantiene durante al menos 4 horas después del tratamiento de las células CD34⁺.

65 La **Figura 10** muestra los resultados de la puntuación de gravedad neurológica (PGNm) del modelo representativo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), el modelo de rata con isquemia. Los resultados

muestran el efecto de tratar células HSPC con dmPGE₂ y medrisona sobre la capacidad de las células para reducir los déficits neurológicos en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO. Se reducen los déficits neurológicos, y mejora la función neurológica, en ratas administradas con HSPC tratadas con la combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en comparación con ratas administradas con células no tratadas o vehículo solo.

La **Figura 11** muestra los resultados del ensayo de faltas de pie de un modelo representativo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), el modelo de rata con isquemia. Los resultados muestran el efecto de tratar HSPC con dmPGE₂ y medrisona sobre la capacidad de las células de reducir los déficits locomotores en el modelo de accidente cerebrovascular de MCAO. El déficit locomotor mejora en ratas administradas con HSPC tratadas con la combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en comparación con las ratas administradas con células no tratadas o vehículo solo.

Descripción detallada

A. Visión general

La invención proporciona un método de preparación de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas como se define en las reivindicaciones, que se tratan *ex vivo* para mejorar las propiedades terapéuticas de las células. En particular, el método de la presente invención comprende modificar las células madre y progenitoras hematopoyéticas *ex vivo* tratando brevemente las células con uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina y uno o más glucocorticoides. Las células terapéuticas obtenidas por el método de la invención expresan inesperadamente altos niveles de CXCR4 en comparación con las células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas no tratadas. En realizaciones particulares, las células farmacológicamente mejoradas obtenidas por el método de la invención se caracterizan por un aumento en la expresión génica de CXCR4 de al menos aproximadamente 30 veces en comparación con las células no tratadas. En diversas realizaciones, las células terapéuticas son células CD34⁺.

Se cree que CXCR4 se asocia a un elevado alojamiento e injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas y, por tanto, las células madre y progenitoras hematopoyéticas tratadas obtenidas por el método de la invención tienen propiedades terapéuticas mejoradas, que incluyen, por ejemplo, elevado alojamiento en la médula ósea y tejido dañado por isquemia, así como propiedades proliferativas y regenerativas mejoradas.

Las células desveladas obtenidas por el método de la invención y las composiciones que contienen dichas células mejoradas son útiles para tratar afecciones y trastornos donde se necesitan o son beneficiosos elevados números de células madre y progenitoras hematopoyéticas, que incluyen, entre otros tratamientos, trasplantes de células madre hematopoyéticas y en el tratamiento de tejido dañado por isquemia. Sin desear quedar ligado a teoría, la presente invención contempla, en parte, que los elevados niveles de proteína CXCR4 sobre la superficie de las células madre y progenitoras hematopoyéticas mejoradas mejoran el alojamiento de las células mejoradas en la médula ósea y en los sitios de lesión del tejido. Las células madre y progenitoras hematopoyéticas mejoradas pueden mejorar el desenlace del paciente durante los trasplantes de células madres, aumentando la eficacia de las células madre y progenitoras hematopoyéticas usadas en los trasplantes de células madres, que incluyen, por ejemplo, aumentando el alojamiento y/o el injerto de las células tratadas en la médula ósea, y aumentando la capacidad de las células tratadas para su autorrenovación y proliferación *in vivo* después de la administración a un paciente.

Las células madre y progenitoras hematopoyéticas mejoradas obtenidas por el método de la invención pueden mejorar el desenlace del paciente cuando se usan para tratar tejido isquémico o tejido dañado por isquemia, por ejemplo, mejorando la vascularización en tejido isquémico, mejorando la regeneración de tejido en los sitios de isquemia, disminuyendo la necrosis o apoptosis de tejido isquémico y/o aumentando la supervivencia celular en los sitios de isquemia.

B. Definiciones

Los artículos "un", "una", "el" y "la" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El uso del alternativo (por ejemplo, "o") se debe entender que significa uno cualquiera, ambos, o cualquier combinación de las mismas de las alternativas. Como se usa en el presente documento, los términos "incluir" y "comprender" se usan sinónimamente.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía nada menos que 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % con respecto a una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud. En una realización, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión,

tamaño, cantidad, peso o longitud $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ o $\pm 1\%$ de aproximadamente una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud.

5 El término "*ex vivo*" se refiere, en general, a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, tal como experimentación o mediciones hechas en o sobre tejido vivo en un entorno artificial fuera del organismo, preferentemente con alteración mínima de las condiciones naturales. En realizaciones particulares, los procedimientos "*ex vivo*" implican células vivas o tejidos tomados de un organismo y cultivados en un aparato de laboratorio, normalmente en condiciones estériles, y normalmente durante algunas horas o hasta aproximadamente 10 24 horas, pero que incluyen hasta 48 o 72 horas, dependiendo de las circunstancias. En ciertas realizaciones, dichos tejidos o células se pueden recoger y congelar, y después descongelar para el tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejido que duran más de algunos días usando células vivas o tejido se consideran normalmente que son "*in vitro*", aunque en ciertas realizaciones, este término se puede usar indistintamente con *ex vivo*.

15 Las relaciones "administración *ex vivo*", "tratamiento *ex vivo*" o "uso terapéutico *ex vivo*" se refieren, en general, a procedimientos médicos en los que uno o más órganos, células o tejidos se obtienen de un sujeto vivo o recientemente fallecido, se purifican/enriquecen opcionalmente, se exponen a un tratamiento o procedimiento (por ejemplo, una etapa de administración *ex vivo* que implica incubar las células con una composición o agente de la presente invención para mejorar la expansión de células particulares, tales como células madre o progenitoras hematopoyéticas). Las células tratadas *ex vivo* se pueden administrar al donante o a un sujeto vivo diferente.

20 El término "*in vivo*" se refiere, en general, a actividades que tienen lugar dentro de un organismo, tal como injerto de células, alojamiento de células, autorrenovación de células y expansión de células. El término "expansión *in vivo*" se refiere a la capacidad de una población de células para aumentar en número *in vivo*. La expansión *in vivo* incluye opcionalmente la autorrenovación y/o proliferación de células madre.

25 "Mejorar" o "promover", o "aumentar" o "activar", se refieren, en general, a la capacidad de un agente para producir o provocar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por o el vehículo o una molécula/composición de control, por ejemplo, elevado injerto/potencial de injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas y elevada expansión de células madre *in vivo*. Una respuesta fisiológica medible puede incluir un aumento en el injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas, viabilidad, alojamiento, autorrenovación y/o expansión, entre otros evidentes del entendimiento en la técnica y la descripción en el presente documento. En una realización, el aumento puede ser un aumento en la expresión génica como resultado de la elevada señalización mediante las vías de señalización de células de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄, que incluyen, pero no se limitan a, un aumento en la fosforilación de CREB, un aumento en la expresión de CREM y un aumento en la expresión de CXCR4. También se puede determinar el aumento en el injerto de células madre y progenitoras hematopoyéticas, la viabilidad, el alojamiento, la autorrenovación y/o expansión *in vivo*, usando métodos conocidos en la técnica, tales como expresión génica, ensayos de UFC-C, ensayos de UFC-S, 30 ensayos de CAFC y expresión de proteínas de la superficie celular, entre otros. Una cantidad "elevada" o "mejorada" normalmente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control.

35 "Disminuir" o "bajar", o "disminuir" o "reducir", o "remitir", se refieren, en general, a la capacidad de un agente para producir o provocar una menor respuesta fisiológica (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por o el vehículo o una molécula/composición de control, por ejemplo, apoptosis reducida. En una realización, la disminución puede ser una disminución en la expresión génica o una disminución en la señalización de células que normalmente se asocia con una reducción de la viabilidad celular. Una "disminución" o cantidad "reducida" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control.

45 "Mantener" o "preservar", o "mantenimiento" o "sin cambio", o "sin cambio sustancial" o "sin disminución sustancial", se refieren, en general, a la capacidad de un agente para producir o provocar una respuesta fisiológica comparable (es decir, efectos posteriores) en una célula, en comparación con la respuesta provocada por o el vehículo o una molécula/composición de control (respuesta de referencia). Una respuesta comparable es una que no es significativamente diferente o mediblemente diferente de la respuesta de referencia.

50 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera de otro modo, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo establecido de etapas o elementos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por 55 "que consiste en" se indica que incluye, y se limita a, cualquier cosa que siga a la expresión "que consiste en". Así, la expresión "que consiste en" indica que los elementos listados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar

presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se indica que incluye cualquier elemento listado después de la expresión, y se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos listados. Así, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos listados se requieren o son obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede o puede no estar presente dependiendo de si afectan o no la actividad o acción de los elementos listados.

En ciertas realizaciones, las células terapéuticas obtenidas por el método de la invención comprenden un distintivo génico único o sustancialmente único. Como se usa en el presente documento, el término "perfil de expresión génica", "distintivo de expresión génica" o "distintivo génico" se refiere a los niveles de expresión de múltiples genes diferentes medidos para la misma muestra, es decir, una población de células. Se puede definir un distintivo de expresión génica para identificar un grupo de genes "genes distintivo" que sirve para distinguir las células terapéuticas de las células existentes en la técnica y/o control, vehículo, o células no tratadas.

Un "gen distintivo", como se usa en el presente documento, significa cualquier gen en un conjunto de genes distintivos. Por ejemplo, los genes distintivos incluyen hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), elemento modulador sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), el antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) y el receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4). Por claridad, los genes distintivos no incluyen genes de mantenimiento.

"Expresión génica", como se usa en el presente documento, se refiere a los niveles relativos de expresión y/o patrón de expresión de un gen en una muestra biológica, tal como las células madre y progenitoras, o población de células que comprenden las células madre o progenitoras. Las células madre o progenitoras son células madre y progenitoras hematopoyéticas.

Cualquier método disponible en la técnica para detectar la expresión de los genes que caracterizan las células que comprenden la composición terapéutica de la invención está englobado en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "detectar la expresión" significa determinar la cantidad o presencia de un transcrito de ARN o su producto de expresión de un gen. Los métodos de detección de la expresión de genes, es decir, la pauta de expresión génica, incluyen métodos basados en el análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en la secuenciación de polinucleótidos, métodos inmunohistoquímicos y métodos basados en proteómica. Los métodos detectan, en general, productos de expresión (por ejemplo, ARNm) de los genes de interés. En algunas realizaciones, se usan métodos basados en PCR, tales como PCR con retrotranscripción (RT-PCR) (Weis et al., TIG 8:263-64, 1992) y métodos basados en matriz tales como micromatriz (Schna et al., Science 270:467-70, 1995).

Referencia en toda esta memoria descriptiva a "una realización" significa que un rasgo, estructura o característica particular descrito a propósito de la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Así, las apariciones de la expresión "en una realización" en diversos sitios en toda esta memoria descriptiva no son todas necesariamente con referencia a la misma realización. Además, el rasgo, estructura o característica particular se puede combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

C. Células madre y progenitoras hematopoyéticas

La invención proporciona un método de preparación de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas como se define en las reivindicaciones, en donde las células madre se han puesto en contacto *ex vivo* con un agente que comprende uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y un agente que comprende uno o más glucocorticoides; en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en las células madre hematopoyéticas humanas tratadas en al menos aproximadamente 30 veces en comparación con las células madre y progenitoras hematopoyéticas no contactadas o células tratadas con un control de vehículo.

Las células madre hematopoyéticas son células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de glóbulos sanguíneos de un organismo, que incluyen linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK) y otros conocidos en la técnica (véanse Fei, R., et al., patente de EE. UU. N° 5.635.387; McGlave et al., patente de EE. UU. N° 5.460.964; Simmons, P., et al., patente de EE. UU. N° 5.677.136; Tsukamoto, et al., patente de EE. UU. N° 5.750.397; Schwartz et al., patente de EE. UU. N° 5.759.793; DiGuisto et al., patente de EE. UU. N° 5.681.599; Tsukamoto et al., patente de EE. UU. N° 5.716.827). Las células progenitoras hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas (HPC) diferenciadas que son capaces de generar todo el repertorio de glóbulos sanguíneos maduros durante la vida útil de un organismo.

Como se usa en el presente documento, el término "célula madre y progenitora hematopoyética" o "HSPC" se refiere a una célula identificada por la presencia del marcador antigénico CD34 (CD34⁺) y se caracterizan, por tanto, como células CD34⁺, y poblaciones de dichas células. En realizaciones particulares, el término "HSPC" se refiere a una célula identificada por la presencia del marcador antigénico CD34 (CD34⁺) y la ausencia de marcadores de linaje (lin) y se caracterizan, por tanto, como células CD34⁺/Lin(-), y poblaciones de dichas células. Se reconoce que la

población de células que comprenden células CD34⁺ y/o Lin(-) también incluyen células progenitoras hematopoyéticas, y así a efectos de la presente solicitud el término "HSPC" incluye células progenitoras hematopoyéticas.

5 "Célula madre y progenitora hematopoyética mejorada" o "HSPC mejorada" se refiere a una HSPC tratada *ex vivo* con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en la célula en al menos aproximadamente 30 veces en comparación con el control, vehículo o células no tratadas.

10 Como se usa en el presente documento, una célula "no contactada" o una "no tratada" es una célula que no se ha tratado, por ejemplo, cultivado, contactado o incubado con un agente distinto de un agente de control. Las células contactadas con DMSO (un agente de control), o contactadas con otro vehículo, son las células no contactadas.

15 Las HSPC obtenidas por el método de la invención se identifican y se caracterizan por un perfil de expresión génica que indica altos niveles de la expresión de CXCR4. Las HSPC también se pueden caracterizar basándose en la elevada expresión génica de CXCR4 y la elevada expresión de la superficie celular del polipéptido CXCR4. La expresión génica de CXCR4 en las HSPC obtenidas por el método de la invención aumenta en al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en las células no contactadas.

20 En realizaciones particulares, la expresión génica de CXCR4 en las HSPC aumenta en aproximadamente 30 a aproximadamente 80 veces en comparación con las HSPC no tratadas. En realizaciones adicionales, la expresión génica de CXCR4 en las HSPC aumenta en aproximadamente 40 a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 50 a aproximadamente 80 veces, aproximadamente 60 a aproximadamente 80 veces, o aproximadamente 50 a aproximadamente 70 veces, en comparación con HSPC no tratadas.

25 La expresión génica de CXCR4 o el distintivo de expresión génica de las HSPC tratadas se puede determinar después de que las células se traten con uno o más agentes. Por ejemplo, se pueden tratar HSPC *ex vivo* con uno o más agentes, lavar para retirar el (los) agente(s) y analizar la expresión génica sin incubación adicional de las células.

30 Las HSPC humanas contactadas en los métodos de la invención y que tienen propiedades terapéuticas mejoradas también se pueden caracterizar en múltiples y diversas otras formas, tales como por elevados niveles de señalización de AMPc intracelular, por ejemplo, fosforilación de CREB, o como se ha determinado por un ensayo bioquímico; distintivos de expresión génica que indican regulación por incremento de genes implicados en la vía de señalización de células de PGE₂R₂/R4, por ejemplo, CREM, y genes que aumentan el alojamiento y el injerto de células madre y progenitoras, por ejemplo, CXCR4, como se ha determinado por ensayos de expresión génica, por ejemplo, micromatrices; disminución no medible en la viabilidad de células madre y progenitoras como se ha determinado por los ensayos de viabilidad celular, por ejemplo, tinción con 7-aminoactinomicina D (7-AAD); y/o un aumento de la capacidad de las células madre para autorrenovarse como se ha determinado por un ensayo de unidades formadoras de colonias (UFC-C), por ejemplo.

1. Determinación de la expresión génica

45 "Expresión génica" como se usa en el presente documento se refiere a los niveles relativos de expresión y/o patrón de expresión de un gen, tal como CXCR4, en una muestra biológica, tal como células madre y progenitoras, o una población de células que comprende las células madre o progenitoras, en una composición terapéutica de la invención. Una muestra puede comprender una población de células heterogénea u homogénea y las poblaciones de células se pueden purificar o no purificar de la muestra. La expresión de un gen, tal como CXCR4, se puede medir al nivel de ADNc, ARN, ARNm, o combinaciones de los mismos.

50 Cualquier método disponible en la técnica para detectar la expresión del gen CXCR4 está englobado en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "detectar la expresión" significa determinar la cantidad o presencia de un transcrito de ARN o su producto de expresión de un gen. Los métodos de detección de la expresión de genes incluyen métodos basados en PCR, análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en secuenciación de polinucleótidos, métodos inmunohistoquímicos y métodos basados en proteómica. Los métodos, en general, detectan productos de expresión (por ejemplo, ARNm) de los genes de interés. En algunas realizaciones, se usan los métodos basados en PCR, tales como PCR con retrotranscripción (RT-PCR) (Weis et al., TIG 8:263-64, 1992) y los métodos basados en matriz, tales como micromatriz (Schena et al., Science 270:467-70, 1995).

60 Se conocen bien en la técnica los métodos generales para la extracción de ARN y se desvelan en libros de texto estándar de biología molecular, que incluyen Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999. En particular, se puede realizar el aislamiento de ARN usando un kit de purificación, un conjunto de tampón y proteasa de fabricantes comerciales, tales como Qiagen (Valencia, Calif.), según las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, se puede aislar ARN total de células en cultivo usando mini-columnas de Qiagen RNeasy. Se puede usar ARN aislado en los ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se

limitan a, análisis de PCR y matrices de sonda. Un método para la detección de los niveles de ARN implica poner en contacto el ARN aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que se detecta. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 60, 100, 250 o 500 nucleótidos en longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con un gen intrínseco de la presente invención, o cualquier ADN o ARN derivado. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que se está expresando el gen intrínseco en cuestión.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión génica en una muestra implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, por RT-PCR (patente de EE. UU. N° 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-93, 1991), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-78, 1990), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-77, 1989), Q-beta replicasa (Lizardi et al., Bio/Technology 6:1197, 1988), replicación en círculo rodante (patente de EE. UU. N° 5.854.033), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica.

En los aspectos particulares de la invención, se evalúa la expresión génica de CXCR4 por RT-PCR cuantitativa. Se conocen en la técnica numerosos protocolos de PCR o QPCR diferentes y se ejemplifican en el presente documento a continuación y se pueden aplicar o adaptar directamente para su uso usando las composiciones presentemente descritas para la detección y/o cuantificación de CXCR4. Se prefiere la PCR cuantitativa (QPCR) (también denominada PCR en tiempo real) en algunas circunstancias debido a que proporciona no solo una medición cuantitativa, sino también tiempo y contaminación reducidos. En algunos casos, la disponibilidad de las técnicas de pauta de expresión génica completa está limitada debido a requisitos de tejido congelado fresco y equipo de laboratorio especializado, dificultando el uso rutinario de dichas tecnologías en un ámbito clínico. Como se usa en el presente documento, "PCR cuantitativa (o "QPCR en tiempo real") se refiere a la monitorización directa del progreso de amplificación por PCR como ocurre sin la necesidad de muestreo repetido de los productos de reacción. En la PCR cuantitativa, los productos de reacción se pueden monitorizar por un mecanismo de señalización (por ejemplo, fluorescencia) a medida que se generan y son seguidos después de que la señal surja por encima de un nivel de fondo pero antes de que la reacción llegue a una meseta. El número de ciclos requeridos para lograr un nivel de fluorescencia detectable o "umbral" varía directamente con la concentración de dianas amplificables al principio del proceso de PCR, que permite una medida de la intensidad de señal para proporcionar una medida de la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra en tiempo real.

Se puede usar la "normalización" para eliminar la variación entre muestras. Para datos de micromatrices, el proceso de normalización tiene el objetivo de eliminar los errores sistemáticos equilibrando las intensidades de fluorescencia de los dos colorantes de etiquetado. El sesgo del colorante puede proceder de diversas fuentes que incluyen diferencias en las eficiencias de etiquetado del colorante, sensibilidades al calor y a la luz, así como parámetros de barrido para el barrido de dos canales. Algunos métodos comúnmente usados para calcular el factor de normalización incluyen: (i) normalización global que usa todos los genes sobre la matriz, tal como por análisis multimatricial robusto (RMA) de escala logarítmica; (ii) normalización de genes de mantenimiento que usa genes de mantenimiento/invariantes constantemente expresados; y (iii) normalización de controles internos que usa una cantidad conocida de genes de control exógeno añadidos durante la hibridación (Quackenbush (2002) Nat. Genet. 32 (Suppl.), 496-501). En una realización, la expresión de los genes desvelados en el presente documento se puede determinar normalizando la expresión para controlar la de genes de mantenimiento o realizando un análisis multimatricial robusto (RMA) de escala logarítmica.

2. Perfil de expresión génica de células madre o progenitoras

Las composiciones terapéuticas comprenden una población de células madre o progenitoras tratadas que tienen elevadas propiedades terapéuticas relacionadas con el tratamiento de tejido isquémico. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, el tratamiento de las células con un agonista de la vía de la prostaglandina y/o un glucocorticoide infunde a las células propiedades terapéuticas elevadas útiles para tratar tejido isquémico o cada vez más síntomas asociados a un tejido isquémico. Las células que tienen un aumento de propiedades terapéuticas se caracterizan por la elevada expresión génica de CXCR4 y la elevada expresión de la superficie celular del polipéptido CXCR4. En una realización particular, la composición terapéutica comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas caracterizadas por elevados niveles de la expresión génica y de CXCR4 de la superficie celular.

Las células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, tratadas con un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide se pueden caracterizar por al menos a 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 veces de aumento en la expresión génica de CXCR4 en comparación con la expresión de CXCR4 en células no tratadas.

Las células que tienen elevadas propiedades terapéuticas se pueden caracterizar además por un distintivo de expresión génica único en donde aumenta la expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o los 10 de los distintivos génicos

seleccionados del grupo que consiste en: CXCR4, hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), elemento modulador sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1) y el antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), en comparación con las células no tratadas.

En otras realizaciones particulares, las células madre o progenitoras hematopoyéticas tratadas con un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide tienen un distintivo de expresión génica, en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los genes distintivos aumentan en al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 veces en comparación con las células no tratadas. En algunas realizaciones, el cambio en veces promedio de todos los genes distintivos es al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30 o 35 veces. En algunas realizaciones, el cambio en veces promedio de todos los genes distintivos es al menos aproximadamente 25 o 30 veces.

La expresión génica o el distintivo de expresión génica de las células madre o progenitoras tratadas se puede determinar después de que las células se traten con un agente, o las células se pueden incubar durante un cierto periodo de tiempo después del tratamiento antes de determinar el distintivo de expresión génica de las células. Por ejemplo, las células se pueden tratar *ex vivo* con uno o más agentes, lavar para retirar los agentes y analizar la expresión génica sin incubación adicional de las células. Alternativamente, en algunas realizaciones, las células se tratan con uno o más agentes, lavar para retirar los agentes de la población de células y luego las células se incuban *ex vivo* durante un cierto periodo de tiempo antes de analizar el distintivo de expresión génica de las células.

3. Fuentes de HSPC

Las HSPC preparadas en los métodos de la invención se pueden obtener de cualquier fuente de células madre y progenitoras hematopoyéticas adecuada, y se pueden proporcionar, y tratar, como una población altamente purificada de HSPC (una población homogénea), o como una composición que comprende desde 0,01 % hasta aproximadamente 100 % de HSPC (una población heterogénea). Por ejemplo, y sin limitación, las HSPC se pueden proporcionar en composiciones tales como médula ósea no fraccionada (en la que células CD34⁺ comprenden menos de aproximadamente 1 % de la población de células de la médula ósea), sangre del cordón umbilical, sangre placentaria, placenta, sangre fetal, hígado fetal, bazo fetal, gelatina de Wharton o sangre periférica movilizada.

Las fuentes adecuadas de HSPC para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, células aisladas u obtenidas de un órgano del cuerpo que contiene células de origen hematopoyético. Por "aislado" se indica material que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una célula se aísla si se separa de algunos o todos de los componentes que normalmente la acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, una "población de células aisladas", una "fuente de células aisladas" o "HSPC aisladas" y similares, como se usa en el presente documento, se refiere a separación *in vitro* o *ex vivo* de una o más células de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes del tejido u órgano, es decir, no se asocia significativamente a sustancias *in vivo*.

Las HSPC se pueden obtener o aislar de médula ósea de adultos, que incluye fémures, cadera, costillas, esternón y otros huesos. Se pueden obtener aspirados de médula que contienen HSPC o aislar directamente de la cadera usando una aguja y jeringa. Otras fuentes de HSPC incluyen sangre del cordón umbilical, sangre placentaria, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta, sangre fetal, hígado fetal o bazo fetal. En realizaciones particulares, la recogida de una cantidad suficiente de HSPC para su uso en aplicaciones terapéuticas puede requerir movilizar las células madre y progenitoras en el donante.

"Movilización de células madre hematopoyéticas" se refiere a la liberación de células madre de la médula ósea en la circulación de la sangre periférica con el fin de leucaféresis, antes del trasplante de las células madre. Aumentando el número de células madre recogidas del donante, puede mejorar significativamente el número de células madre disponibles para aplicaciones terapéuticas. Se usan frecuentemente factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o los agentes quimioterapéuticos para estimular la movilización. Existen fármacos comerciales de movilización de células madre y se pueden usar en combinación con G-CSF para movilizar cantidades suficientes de células madre y progenitoras hematopoyéticas para el trasplante en un sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar G-CSF y Mozobil™ (Genzyme Corporation) a un donante para recoger un número suficiente de células hematopoyéticas para el trasplante. Otros métodos de movilización de células madre y progenitoras hematopoyéticas serían evidentes para un experto en la técnica.

En realizaciones particulares, las HSPC se obtienen de sangre del cordón umbilical. La sangre del cordón se puede recoger según técnicas conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 7.147.626 y 7.131.958).

En una realización, se pueden obtener HSPC de fuentes de células madre pluripotentes, por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y células madre embrionarias (CME). Como se usa en el presente documento, el término "célula madre pluripotente inducida" o "CMPi" se refiere a una célula no pluripotente que se ha reprogramado a un estado pluripotente. Una vez las células de un sujeto se han reprogramado a un estado pluripotente, las células se pueden programar entonces a un tipo de célula deseado, tal como una célula madre o progenitora hematopoyética. Como se usa en el presente documento, el término "reprogramación" se refiere a un

método de aumento de la potencia de una célula hasta un estado menos diferenciado. Como se usa en el presente documento, el término "programación" se refiere a un método de disminución de la potencia de una célula o diferenciación de la célula en uno o más estados diferenciados.

5 4. Composiciones celulares terapéuticas

También se desvela un método de preparación de una composición terapéutica, que comprende las HSPC mejoradas descritas en el presente documento. En particular, la composición terapéutica comprende una población de células que comprende HSPC en donde las HSPC se han puesto en contacto *ex vivo* con un agente que comprende uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y un agente que comprende uno o más glucocorticoides, y en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en las HSPC en al menos aproximadamente 30 veces con respecto a HSPC no contactadas. En ciertas realizaciones, la composición terapéutica que comprende las HSPC mejoradas es médula ósea completa, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada.

En realizaciones particulares, la composición terapéutica obtenida por el método de la invención comprende una población de células, en donde la población de células es aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de HSPC. La invención contempla, en parte, que el uso de composiciones terapéuticas de HSPC altamente purificadas, por ejemplo, una composición que comprende una población de células en donde las células comprenden aproximadamente 95 % de HSPC, puede mejorar la eficiencia de las terapias de células madre. Los métodos de trasplantes actualmente puestos en práctica usan normalmente mezclas sin fraccionar de células donde las HSPC comprenden menos de 1 % de la población total de células.

En algunas realizaciones, la composición terapéutica obtenida por el método de la invención comprende una población de células, en donde la población de células comprende menos de aproximadamente 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % de HSPC. La población de células obtenidas por el método de la invención en algunas realizaciones comprende menos de aproximadamente 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % de HSPC. En otras realizaciones, la población de células obtenidas por el método de la invención es aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 15 %-20 %, aproximadamente 20 %-25 %, aproximadamente 25 %-30 %, aproximadamente 30 %-35 %, aproximadamente 35 %-40 %, aproximadamente 40 %-45 %, aproximadamente 45 %-50 %, aproximadamente 60 %-70 %, aproximadamente 70 %-80 %, aproximadamente 80 %-90 %, aproximadamente 90 %-95 %, o aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de HSPC.

En realizaciones particulares, la población de células obtenidas por el método de la invención es aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 %, aproximadamente 1 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %- aproximadamente 15 %, aproximadamente 15 %-20 %, aproximadamente 20 %-25 %, aproximadamente 25 %-30 %, aproximadamente 30 %-35 %, aproximadamente 35 %-40 %, aproximadamente 40 %-45 %, aproximadamente 45 %-50 %, aproximadamente 60 %-70 %, aproximadamente 70 %-80 %, aproximadamente 80 %-90 %, aproximadamente 90 %-95 % o aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de HSPC.

Las HSPC en las composiciones terapéuticas obtenidas por el método de la invención pueden ser autólogas/autógenas ("propias) o no autólogas ("no propias," por ejemplo, alógenas, singénicas o xenógenas) con respecto a un sujeto al que se va a administrar la composición terapéutica. "Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. "Alógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que se diferencian genéticamente con la célula en comparación. "Singénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En realizaciones particulares, las HSPC de la invención son alógenas o autólogas.

Las HSPC para su uso en los métodos de la presente invención pueden estar agotadas de células hematopoyéticas maduras, tales como linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos, células eritroides y sus precursores diferenciados de aspirado de médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada (producto de leucaféresis movilizada). Las células maduras de linaje diferenciado se agotan por inmunodepleción, por ejemplo, marcando sustratos sólidos con anticuerpos que se unen a un panel de los denominados antígenos de "linaje": CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 y CD235a. Se puede realizar una etapa posterior para purificar adicionalmente la población de células, en las que un sustrato marcado con anticuerpos que se unen al antígeno CD34⁺ se usa para aislar células madre y progenitoras hematopoyéticas primitivas. Están comercialmente disponibles kits para purificar células madre y progenitoras a partir de diversas fuentes de células y en realizaciones particulares, estos kits son adecuados para su uso con los métodos de la presente invención. Los kits comercialmente disponibles a modo de ejemplo para purificar células madre y progenitoras incluyen, pero no se limitan a, el kit Lineage (Lin) Depletion (Miltenyi Biotec); el kit de enriquecimiento de CD34⁺ (Miltenyi Biotec); RosettaSep (Stem Cell Technologies).

En una realización, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es al menos $0,1 \times 10^5$ células, al menos $0,5 \times 10^5$ células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 10×10^5 células, al menos $0,5 \times 10^6$ células, al menos $0,75 \times 10^6$ células, al menos 1×10^6 células, al menos $1,25 \times 10^6$ células, al menos $1,5 \times 10^6$ células, al menos $1,75 \times 10^6$ células, al menos 2×10^6 células, al menos $2,5 \times 10^6$ células, al menos 3×10^6 células, al menos 4×10^6 células, al menos 5×10^6 células, al menos 10×10^6 células, al menos 15×10^6 células, al menos 20×10^6 células, al menos 25×10^6 células, o al menos 30×10^6 células.

En una realización particular, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es aproximadamente $0,1 \times 10^5$ células a aproximadamente 10×10^5 células; aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células a aproximadamente 5×10^6 células; aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 3×10^6 células; aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células; o aproximadamente 2×10^6 células a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células.

En una realización particular, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 3×10^6 células; aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 5×10^6 células; aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células, aproximadamente 10×10^6 células a aproximadamente 20×10^6 células, aproximadamente 10×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células, o aproximadamente 20×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células.

En otra realización, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es aproximadamente 1×10^6 células a aproximadamente 30×10^6 células; aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 20×10^6 células; aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células, aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 30×10^6 células, aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 20×10^6 células, o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células a aproximadamente 10×10^6 células.

En una realización particular, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es aproximadamente 1×10^6 HSPC, aproximadamente 2×10^6 células, aproximadamente 5×10^6 células, aproximadamente 7×10^6 células, aproximadamente 10×10^6 células, aproximadamente 15×10^6 células, aproximadamente 17×10^6 células, aproximadamente 20×10^6 células aproximadamente 25×10^6 células, o aproximadamente 30×10^6 células.

En una realización, la cantidad de HSPC en la composición terapéutica obtenida por el método de la invención es la cantidad de HSPC en un cordón parcial o individual de sangre, o es al menos $0,1 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^5 células/kg de peso corporal, al menos $0,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $0,75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $1,25 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1,75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 2×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $2,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 3×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 15×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 20×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 25×10^6 células/kg de peso corporal, o al menos 30×10^6 células/kg de peso corporal.

D. Métodos de preparación de las células mejorada de la invención

La invención contempla en parte métodos de preparación de HSPC caracterizados por elevados niveles de la expresión génica de CXCR4 como se define en las reivindicaciones. El método de preparación de las HSPC comprende tratar HSPC *ex vivo* con un agente que comprende uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina y uno o más glucocorticoides para aumentar la expresión génica de CXCR4 en al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas.

Como se usa en el presente documento, los términos "condiciones suficientes" o "en condiciones suficientes" se refieren a las condiciones para tratar las HSPC con uno o más agentes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células hasta niveles sorprendentes e inesperados en comparación con el control, vehículo o células no tratadas.

Las condiciones incluyen, pero no se limitan a, la fuente de las células, los agentes usados para tratar las células y las concentraciones de agente(s), el tiempo que las células se exponen al (a los) agente(s) y la temperatura de tratamiento.

1. Agentes útiles en la preparación de células mejoradas

Como se usa en el presente documento, "agente" se refiere a un compuesto o molécula capaz de aumentar la expresión génica de CXCR4 en HSPC tratadas con el agente, y se refiere a compuestos que aumentan la expresión de CXCR4 cuando se usa tanto solo como en combinación con otro compuesto o molécula. En el método de la invención, se usa una combinación de agonistas del receptor de la prostaglandina, así como glucocorticoides, en la

preparación de las HSPC mejoradas.

2. Agonistas de la vía de la prostaglandina

5 Como se usa en el presente documento, el término "agonista de la vía de la prostaglandina" se refiere a un agente que estimula las vías de señalización de células de prostaglandina, que incluye un agente que estimula las vías de señalización de células de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄, y aumenta la expresión génica de CXCR4 en las células. Los ejemplos ilustrativos de agonistas de la vía de la prostaglandina que son adecuados para su uso en el método de la invención incluyen, pero no se limitan a, PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂, 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y análogos de PGE₂. En ciertas realizaciones, son de particular interés PGE₂R₂ y agonistas y análogos PGE₂R₄ del mismo, y en algunas realizaciones, el agente se une preferentemente y activa una PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄.

15 Como se usa en el presente documento, los términos "prostaglandina E₂" o "PGE₂" incluyen, sin limitación, cualquier molécula de PGE₂ que existe de forma natural o químicamente sintetizada, así como "análogos" de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "análogo" o se refiere a una molécula química que es similar a otra sustancia química, por ejemplo, PGE₂, en estructura y función, que se diferencia frecuentemente estructuralmente por un único elemento o grupo, pero se puede diferenciar por modificación de más de un grupo (por ejemplo, 2, 3 o 4 grupos) si retiene la misma función que el producto químico parental. Dichas modificaciones son rutinarias para los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, restos químicos adicionales o sustituidos, tales como ésteres o amidas de un ácido, grupos protectores tales como un grupo bencilo para un alcohol o tiol, y grupos terc-butoxilcarbonilo para una amina. También se incluyen modificaciones a las cadenas laterales de alquilo, tales como sustituciones de alquilo (por ejemplo, metilo, dimetilo, etilo, etc.), modificaciones al nivel de saturación o insaturación de las cadenas laterales, y la adición de grupos modificados tales como fenilo sustituido y fenoxi. Los análogos también pueden incluir conjugados, tales como restos de biotina o avidina, enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y similares, y que incluyen restos radiomarcados, bioluminiscentes, quimioluminiscentes o fluorescentes. Por tanto, los restos se pueden añadir a los agentes descritos en el presente documento para alterar sus propiedades farmacocinéticas, tales como para aumentar la semivida *in vivo* o *ex vivo*, o para aumentar sus propiedades de penetración celular, entre otras propiedades deseables. También se incluyen profármacos, que se conoce que mejoran numerosas cualidades deseables de productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) (véase, por ejemplo, el documento de patente WO/2006/047476 para profármacos agonistas de EP a modo de ejemplo).

35 Los ejemplos ilustrativos de "análogos" de PGE₂ incluyen, sin limitación, 16,16-dimetil PGE₂ ("dmPGE₂"), éster fenílico de 16,16-dimetil PGE₂ p-(p-acetamidobenzamido), 11-desoxi-16,16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metileno-16, 16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metileno PGE₂, 9-ceto Fluprostenol, 5-trans PGE₂, 17-fenil-omega-trinor PGE₂, amida de PGE₂ serinol, éster metílico de PGE₂, 16-fenil tetranor PGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 15(R)-15-metil PGE₂, 8-iso-15-ceto PGE₂, éster isopropílico de 8-iso PGE₂, 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂, 20-hidroxi PGE₂, 20-etil PGE₂, 11-desoxi PGE₁, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto PGE₂ y 19 (R) hidroxi PGE₂. También se incluyen análogos o derivados de PG que tienen una estructura similar a PGE₂ que están sustituidos con halógeno en la posición 9 (véase, por ejemplo, documento de patente WO 2001/12596), así como derivados de prostaglandina 2-decarboxi-2-fosfínica, tales como los descritos en la publicación de EE. UU. N° 2006/0247214).

45 También se pueden usar análogos de PGE₁, que incluyen, sin limitación, alprostadil, para activar las vías de señalización de células de PGE₂R₂ (EP₂) y PGE₂R₄ (EP₄), y se contemplan como agentes útiles en los métodos de la invención.

50 Se contempla que la estimulación/activación de las vías de señalización de células PGE₂R₂ (EP₂) y PGE₂R₄ (EP₄) subyace a las respuestas fisiológicas en HSPC que aumentan el injerto, mantienen la viabilidad celular y aumentan el alojamiento y proliferación de las células. Por consiguiente, en una realización, se contempla un "ligando no basado en PGE₂" que se une a y estimula los receptores PGE₂R₂ y PGE₂R₄ (es decir, un agonista de PGE₂R₂/PGE₂R₄) para su uso en los métodos de la invención.

55 Los ejemplos ilustrativos de agonistas de receptores de EP₂ no basados en PGE₂ incluyen CAY10399, ONO_8815Ly, ONO-AE1-259, CP-533,536 y carbazoles y fluorenos desvelados en documento de patente WO 2007/071456.

60 Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP₄ no basados en PGE₂ incluyen ONO-4819, APS-999 Na, AH23848, ONO-AE1-329 y otros agonistas de EP₄ no basados en PGE₂ desvelados en el documento de patente WO/2000/038663; la patente de EE. UU. N° 6.747.037; y la patente de EE. UU. N° 6.610.719).

65 Los agentes selectivos para el receptor de PGE₂ EP₄ se unen preferentemente a y activan los receptores de PGE₂ EP₄. Dichos agentes tienen una afinidad más alta por el receptor de EP₄ que por cualquiera de los otros tres receptores de EP, concretamente EP₁, EP₂ y EP₃. Los agentes que se unen selectivamente al receptor de PGE EP₄ incluyen, pero no se limitan a, agentes seleccionados del grupo que consiste en: 5-[(1E,3R)-4,4-difluoro-3-hidroxi-4-fenil-1-buten-1-il]-1-[6-(2H-tetrazol-5R-il)hexil]-2-pirrolidinona; ácido 2-[3-[(1R,2S,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-5-

[2-(metoximetil)fenil]pent-1-enil]-5-oxociclopentil]sulfanilpropilsulfanil]acético; 4-[2-[(1R,2R,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-4-[3-(metoximetil)fenil]but-1-enil]-5-oxociclopentil]etil]sulfanil]butanoato de metilo; 16-(3-metoximetil)fenil-ro-tetranor-5-tiaPGE₂; 5-[3-[(2S)-2-[(3R)-3-hidroxi-4-[3-(trifluorometil)fenil]butil]-5-oxopirrolidin-1-il]propil]tiofeno-2-carboxilato; (3-metil-tiofeno-2-carbonil)-amida] de ácido [4'-[3-butil-5-oxo-1-(2-trifluorometil-fenil)-1,5-dihidro-[1,2,4]triazol-4-ilmetil]-bifenil-2-sulfónico; y ácido ((Z)-7-[(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico), y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos agentes.

En realizaciones particulares, el agonista de la vía de la prostaglandina es PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂.

3. Glucocorticoides

Los ejemplos ilustrativos de glucocorticoides y agonistas de receptor de glucocorticoides adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol, así como combinaciones de los mismos.

En realizaciones particulares, el glucocorticoide comprende medrisona, hidrocortisona, triamcinolona, alclometasona, o dexametasona. En realizaciones más particulares, el glucocorticoide es medrisona.

4. Combinaciones de agentes

Se usan combinaciones de agentes como se define en las reivindicaciones en el método de la invención, y dan como resultado un aumento sinérgico inesperado en el gen CXCR4 y la expresión de proteínas en células tratadas. En particular, las HSPC tratadas con combinaciones de agonistas de la vía de la prostaglandina y glucocorticoides presentan un aumento inesperadamente alto en el gen CXCR4 y la expresión de proteínas, y esto se correlaciona con propiedades terapéuticas mejoradas de las células tratadas en comparación con el control, vehículo o células no tratadas.

En el método de la invención, las HSPC se tratan con una combinación de uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y uno o más glucocorticoides.

En realizaciones particulares de la invención, el agonista de la vía de la prostaglandina en la combinación es un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄. En otras realizaciones de la invención, el agonista de la vía de la prostaglandina comprende PGE₂, o un análogo de PGE₂ o derivado del mismo. En realizaciones particulares, el agonista de la vía de la prostaglandina es PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂. En realizaciones más particulares de la invención, el agonista de la vía de la prostaglandina es PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂.

En algunas realizaciones, el glucocorticoide en la combinación se selecciona del grupo que consiste en medrisona, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

En realizaciones más particulares, el glucocorticoide en la combinación comprende medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona. En una realización, el glucocorticoide es medrisona.

En algunas realizaciones, las HSPC se tratan con una combinación que comprende un agonista de la vía de la prostaglandina seleccionado del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y uno o más glucocorticoides. En una realización particular, las HSPC se tratan con una combinación que comprende PGE₂ o dmPGE₂ y un glucocorticoide.

En algunas realizaciones, las HSPC se tratan con una combinación que comprende un agonista de la vía de la prostaglandina seleccionado del grupo que consiste en PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ y 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂, y un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona.

En otras realizaciones, la combinación comprende PGE₂ o dmPGE₂ y medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona. En realizaciones más particulares, las HSPC se tratan con una combinación que comprende PGE₂ o dmPGE₂ y medrisona.

5. Formulaciones de agentes

Usando prácticas PCFa, se pueden formular agentes útiles en la preparación de la composición terapéutica en un disolvente orgánico, tal como acetato de metilo, para su uso en poner en contacto las células de la invención, y se pueden suministrar en un recipiente libre de endotoxinas. Los agentes contemplados por la invención son adecuados para la administración *ex vivo* a las células de mamífero, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el disolvente normalmente es un disolvente orgánico adecuado, como se describe en el presente documento (por ejemplo, DMSO, DMF, DME, etc., que incluye combinaciones o mezclas de los mismos). Se pueden combinar uno o más disolventes en ciertas relaciones. Por ejemplo, se puede combinar una mezcla de dos disolventes en una relación de 9,5:0,5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, etc., que incluye todos los números enteros y puntos decimales.

La relación "disolvente orgánico" o "disolvente orgánico adecuado" se refiere, en general, a líquidos o gases que contienen carbono que disuelven un soluto sólido, líquido o gaseoso, dando como resultado una disolución. Un disolvente orgánico "adecuado" es uno que es apropiado para la administración *ex vivo* a, o incubación con, células de mamífero, y también puede ser apropiado para la administración *in vivo* a un sujeto, tal como por que tiene toxicidad mínima u otros efectos inhibidores en condiciones *ex vivo* (por ejemplo, cultivo celular) o *in vivo* en una concentración seleccionada para el tiempo de incubación o administración. Un disolvente orgánico adecuado también debe ser apropiado para estabilidad durante el almacenamiento y manipulación de los agentes descritos en el presente documento. Los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de dimetilo (DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetoxietano (DME) y dimetilacetamida, que incluyen mezclas o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición o disolvente orgánico está "sustancialmente libre" de acetato de metilo, que significa que no debe haber más de cantidades mínimas de acetato de metilo en la composición o disolvente, y preferentemente cantidades indetectables (por ejemplo, como se mide por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC), etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "libre de endotoxinas" se refiere a recipientes y/o composiciones que contienen como máximo cantidades mínimas (es decir, cantidades que no tienen efectos fisiológicos adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Por "sustancialmente libre de endotoxina" se indica que existe menos endotoxina por dosis de células que la permitida por la FDA para un producto biológico, que es una endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal por día, que para una persona de promedio 70 kg es 350 UE por dosis total de células. En una realización, el término "libre de endotoxinas" se refiere a un recipiente y/o composiciones que está al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % libre de endotoxinas. Las endotoxinas son toxinas asociadas a ciertas bacterias, normalmente bacterias Gram-negativas, aunque las endotoxinas se pueden encontrar en bacterias Gram-positivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más predominantes son lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) encontrados en la membrana externa de diversas bacterias Gram-negativas, y que representan una característica patógena central en la capacidad de estas bacterias para provocar la enfermedad. Pequeñas cantidades de endotoxina en los seres humanos pueden producir fiebre, una reducción de la tensión arterial y la activación de inflamación y coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos. Por tanto, se desea frecuentemente retirar la mayoría o todas las trazas de endotoxina de los recipientes de medicamento, debido a que incluso pequeñas cantidades pueden provocar efectos adversos en los seres humanos. Las endotoxinas se pueden retirar de los recipientes usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los recipientes se pueden limpiar en equipo de lavado filtrado con HEPA con agua sin endotoxinas, despirogenado a 250 °C y envasado de forma limpia en estaciones de trabajo filtradas con HEPA situadas dentro de una sala limpia de clase 100/10 (por ejemplo, una sala limpia de clase 100 no contiene más de 100 partículas mayores que la mitad de un micrómetro en un pie cúbico de aire).

En realizaciones particulares, las HSPC se tratan (por ejemplo, contactas) con uno o más agentes, cada uno a una concentración final de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 100 μM . En ciertas realizaciones, las HSPC se tratan con uno o más agentes, cada uno a una concentración final de aproximadamente 1×10^{-14} M a aproximadamente 1×10^{-3} M, aproximadamente 1×10^{-13} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-12} M a aproximadamente 1×10^{-5} M, aproximadamente 1×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-5} M, aproximadamente 1×10^{-10} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-10} M a aproximadamente 1×10^{-5} M, aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-5} M, aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-7} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-6} M a aproximadamente 1×10^{-4} M, o cualquier intervalo intermedio de concentraciones finales.

En otra realización particular, las HSPC se tratan con uno o más agentes, cada uno a una concentración final de aproximadamente 1×10^{-14} M, aproximadamente 1×10^{-13} M, aproximadamente 1×10^{-12} M, aproximadamente 1×10^{-10} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-7} M a aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-5} M, aproximadamente 1×10^{-4} M, aproximadamente 1×10^{-3} M, o cualquier concentración final intermedia. En los tratamientos que comprenden uno o más agentes, los agentes pueden estar a diferentes concentraciones entre sí o a la misma concentración.

En realizaciones particulares, las HSPC se tratan (por ejemplo, se ponen en contacto con uno o más agentes) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces. Las HSPC pueden ser contactadas intermitentemente, episódicamente, o una detrás de la otra con uno o más agentes dentro del mismo recipiente (por ejemplo, poniendo en contacto la población de células con un fármaco durante un periodo de tiempo, cambiando el medio de cultivo y/o lavando la población de células, luego repitiendo el ciclo con la misma combinación de agentes farmacéuticos o una diferente durante el mismo periodo de tiempo predeterminado o un periodo de tiempo predeterminado diferente).

6. Tratamiento de HSPC

El método de preparación de las HSPC como se desvela comprende tratar HSPC *ex vivo* con uno o más agentes capaces de aumentar las condiciones de expresión génica de CXCR4 suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas. Las HSPC se pueden tratar con los agentes desvelados en el presente documento después del aislamiento de un sujeto. En otra realización, las HSPC se obtienen de un sujeto y se expanden antes del tratamiento con los agentes desvelados en el presente documento. En una realización, las HSPC se obtienen de un sujeto y se crioconservan antes del tratamiento con los agentes desvelados en el presente documento.

Las HSPC se tratan con una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en una cantidad eficaz y durante un tiempo suficiente (es decir, en condiciones suficientes) para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas.

En diversas realizaciones, condiciones de temperatura suficientes incluyen incubación de las HSPC con el uno o más agentes a una temperatura fisiológicamente relevante, tal como un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 39 °C (aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente temperatura corporal), que incluye, pero no se limita a, temperaturas de aproximadamente 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C y 39 °C. En una realización particular, la condición de temperatura suficiente es entre aproximadamente 35 °C y 39 °C. En una realización, la condición de temperatura suficiente es aproximadamente 37 °C.

En diversas realizaciones, una concentración suficiente de un agente es una concentración final de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 μM , aproximadamente 100 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 1 μM , aproximadamente 10 μM , aproximadamente 20 μM , aproximadamente 30 μM , aproximadamente 40 μM , aproximadamente 50 μM , aproximadamente 60 μM , aproximadamente 70 μM , aproximadamente 80 μM , aproximadamente 90 μM , aproximadamente 100 μM , aproximadamente 110 μM , o aproximadamente 120 μM , o cualquier otra concentración intermedia del agente (por ejemplo, 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM). En una realización particular, la concentración suficiente de cada agente es una concentración final de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 25 μM . En una realización, la concentración suficiente de un agente es una concentración final de aproximadamente 10 μM .

En diversas realizaciones, el periodo de tiempo suficiente para tratar las HSPC con uno o más agentes es un periodo de incubación de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 60 minutos a aproximadamente doce horas, aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, y que incluye, pero no se limitan a, tratamiento durante una duración de aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5

horas o aproximadamente 4 horas o cualquier otra duración intermedia. En una realización particular, el periodo de incubación suficiente es aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas. En una realización, el periodo de incubación suficiente para tratar las HSPC es aproximadamente cuatro horas.

5 En realizaciones particulares, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* en un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de un agonista de la vía de la prostaglandina, y aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de un glucocorticoide; e incubación con los
10 agentes durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

15 En realizaciones particulares, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* en un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de PGE₂ o dmPGE₂, y aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de un glucocorticoide; e incubación con los agentes durante aproximadamente 1
20 hora a aproximadamente 4 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

25 En realizaciones particulares, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* en un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de PGE₂ o dmPGE₂, y aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona; e incubación con los agentes
30 (compuestos) durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

35 En realizaciones particulares, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* en un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de un agonista de la vía de la prostaglandina, y aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 μ M de medrisona; e incubación con los agentes
40 durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

45 En otra realización, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* incluyen, incubación a una temperatura de aproximadamente 37 °C (aproximadamente temperatura corporal); una concentración final de PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ aproximadamente 10 μ M, en combinación con una concentración final de aproximadamente 10 μ M de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona; e incubación durante
aproximadamente cuatro horas.

50 En otra realización, las condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en las células contactadas en comparación con las células no contactadas comprende tratar HSPC *ex vivo* incluyen, incubación a una temperatura de aproximadamente 37 °C (aproximadamente temperatura corporal); una concentración final de PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ aproximadamente 10 μ M, en combinación con una concentración final de aproximadamente 10 μ M de medrisona; e incubación durante aproximadamente cuatro horas.
55

60 En realizaciones particulares, se tratan HSPC (por ejemplo, se contactan con uno o más agentes) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces. Las células pueden ser intermitentemente, episódicamente, o uno detrás de las otra, contactadas con uno o más agentes dentro del mismo recipiente (por ejemplo, poner en contacto las HSPC con un agente durante un periodo de tiempo, cambiar el medio de cultivo y/o lavar la población de células, luego repetir el ciclo con la misma combinación de agentes o una diferente durante el mismo periodo de tiempo predeterminado o un periodo de tiempo predeterminado diferente).

E. Usos terapéuticos de las células madre mejoradas

65 Las HSPC descritas en el presente documento tienen elevada expresión del gen y la proteína CXCR4, y también presentan propiedades terapéuticas mejoradas en comparación con las células no tratadas. En particular, las HSPC

obtenidas por el método de la invención presentan un aumento del alojamiento en la médula ósea, sitios de tejido isquémico y tejido dañado por isquemia, y también presentan un elevado injerto. Las HSPC obtenidas por el método de la invención son así útiles para tratar sujetos en necesidad de tratamiento con elevado alojamiento y/o injerto de HSPC en la médula ósea o sitios de isquemia o tejido dañado por isquemia. En ciertas realizaciones, las HSPC obtenidas por el método de la invención también son útiles para mejorar los trasplantes de células madres hematopoyéticas y en el tratamiento de isquemia o tejido dañado por isquemia, y en reducir el daño adicional al tejido isquémico y/o reparar el daño al tejido isquémico mediante el reclutamiento celular, mejorando la vascularización en tejido isquémico, mejorando la regeneración de tejido en los sitios de isquemia, disminuyendo la necrosis o apoptosis de tejido isquémico, y/o aumentando la supervivencia celular en los sitios de isquemia. En realizaciones particulares, las HSPC obtenidas por el método de la invención son útiles para sujetos en necesidad de reconstitución hematopoyética, tal como los sujetos que han recibido o tienen programado recibir terapia mieloablativa.

Como se usa en el presente documento, el término "injerto" se refiere a la capacidad de una célula para integrarse en una ubicación, tal como un tejido, y persistir en la ubicación particular con el tiempo. Las células se pueden injertar en la médula ósea, por ejemplo, o en otra ubicación tal como un sitio de tejido dañado o isquémico. "Alojamiento" se refiere a la capacidad de las HSPC para confinarse, es decir, viajar, a un área o tejido particular. El alojamiento puede incluir el confinamiento de las HSPC administradas en la médula ósea o en otra ubicación tal como un sitio de tejido dañado o isquémico. Las células usan un mecanismo quimioatrayente alojarse en un tejido particular: las células que tienen una elevada expresión de CXCR4 tiene alojamiento mejorado en los tejidos isquémicos que secretan el factor 1 derivado de células del estroma (SDF1), el ligando relacionado CXCR4.

Un "sujeto," como se usa en el presente documento, incluye cualquier humano que presenta un síntoma que se puede tratar con una composición basada en células de la invención, o se puede tratar con HSPC que tienen una elevada expresión del gen CXCR4.

Se desvelan HSPC para su uso en los métodos de tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo que comprenden identificar un sujeto en necesidad, y administrar al sujeto las HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas, tratando así al sujeto en necesidad.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refiere a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que incluye sin limitación lograr una mejora o eliminación de síntomas de una enfermedad. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de alcanzar una mejora o eliminación de síntomas, o proporcionar una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) prevenir que ocurra la enfermedad en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad pero todavía no ha sido diagnosticado con que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, causar la regresión de la enfermedad, por ejemplo, para eliminar completamente o parcialmente los síntomas de la enfermedad; y (d) restaurar al individuo a un estado previo a la enfermedad, por ejemplo, reconstituyendo el sistema hematopoyético.

"Tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, incluyen cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que está tratándose. El "tratamiento" no indica necesariamente, o requiere, la erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de la misma.

1. Métodos de trasplante de células madre

"Sujetos en necesidad" de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético y un aumento del número de HSPC incluyen, pero no se limitan a, sujetos que tienen o que han sido diagnosticados con diversos tipos de leucemias, anemias, linfomas, mielomas, trastornos de inmunodeficiencia y tumores sólidos como se trata en cualquier parte en el presente documento. Un "sujeto" también incluye un humano que es un candidato para el trasplante de células madre o trasplante de médula ósea, tal como durante el transcurso del tratamiento para una enfermedad maligna o un componente de terapia génica. Un sujeto recibe HSPC genéticamente modificadas como terapia génica basada en células. Los sujetos también pueden incluir individuos o animales que donan células madre o médula ósea para trasplante alógeno. Un sujeto puede haber recibido irradioterapia o quimioterapia mieloablativa, o puede haber sufrido una radiación aguda o ataque químico dando como resultado mieloablación. Un sujeto puede haber recibido irradioterapia o quimioterapia, tal como durante diversos tratamientos para el cáncer. Los sujetos típicos incluyen animales que presentan cantidades aberrantes (cantidades más bajas o más altas que un sujeto "normal" o "sano") de una o más actividades fisiológicas que se pueden modular por un agente o una célula madre o trasplante de médula ósea.

5 Los sujetos en necesidad de reconstitución hematopoyética incluyen sujetos que reciben quimioterapia o radioterapia para el cáncer, así como sujetos que padecen (por ejemplo, afectado de) trastornos hematológicos no malignos, particularmente inmunodeficiencias (por ejemplo, SCID, anemia de Fanconi, anemia aplásica grave o hemoglobinopatías congénitas, o enfermedades de almacenamiento metabólico, tales como enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, mannosidosis, entre otros) o cáncer, particularmente tumores malignos hematológicos, tales como leucemia aguda, leucemia crónica (mieloide o linfoide), linfoma (Hodgkin o no Hodgkin), mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico o cánceres no hematológicos tales como tumores sólidos (incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado o cáncer pancreático).

15 Los sujetos también pueden incluir sujetos que padecen anemia aplásica, un trastorno inmunitario (síndrome de inmunodeficiencia combinada grave o lupus), mielodisplasia, talasemia, drepanocitosis o síndrome de Wiskott-Aldrich. El sujeto padece opcionalmente un trastorno que es el resultado de un efecto secundario no deseado o complicación de otro tratamiento primario, tal como radioterapia, quimioterapia, o tratamiento con un fármaco supresor de la médula ósea, tal como zidovadina, cloranfenicol o gangciclovir. Dichos trastornos incluyen neutropenias, anemias, trombocitopenia y disfunción inmunitaria.

20 Otros sujetos pueden tener trastornos provocados por una infección (por ejemplo, infección viral, infección bacteriana o infección fúngica) que provoca daño a las células madre o progenitoras de la médula ósea.

25 Además, el sujeto que padece las siguientes afecciones también se puede beneficiar del tratamiento usando HSPC obtenidas por el método de la invención: linfocitopenia, linforrea, linfostasis, eritrocitopenia, trastornos eritrodegenerativos, eritroblastopenia, leucoeritroblastosis; eritroclasis, talasemia, mielofibrosis, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada (CID), púrpura trombocitopénica inmune (autoinmune) (PTI), PTI inducida por el VIH, mielodisplasia; enfermedad trombocitósica, trombocitosis, neutropenias congénitas (tales como síndrome de Kostmann y síndrome de Schwachman-Diamond), neutropenias asociadas a neoplasias, neutropenia cíclica en la infancia y de adulto; neutropenia postinfecciosa; síndrome mielodisplásico; neutropenia asociada a quimioterapia y radioterapia; enfermedad granulomatosa crónica; mucopolisacaridosis; Diamond-Blackfan; drepanocitosis; o beta-talasemia mayor.

35 El sujeto es opcionalmente un donante de médula ósea que ha donado médula ósea, es un donante de médula ósea que tiene todavía que donar médula ósea, es un receptor del trasplante del donante de médula ósea, tiene células progenitoras hematopoyéticas en estrés medioambiental, tiene anemia, tiene un nivel reducido de función celular inmunitaria en comparación con un sujeto normal, o tiene una deficiencia del sistema inmunitario.

40 El sujeto tiene opcionalmente mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia no linfoblástica aguda o pre-leucemia.

45 El sujeto está opcionalmente en necesidad de terapia génica, tal como, por ejemplo, una hemoglobinopatía. Como se usa en el presente documento, el término "hemoglobinopatía" o "afección hemoglobinopática" incluye cualquier trastorno que implique la presencia de una molécula de hemoglobina anormal en la sangre. Los ejemplos de hemoglobinopatías incluyeron, pero no se limitan a, enfermedad de la hemoglobina C, drepanocitosis de la hemoglobina (SCD), anemia de células falciformes y talasemias. También se incluyen hemoglobinopatías en las que están presentes una combinación de hemoglobinas anormales en la sangre (por ejemplo, enfermedad de células falciformes/Hb-C).

50 El término "anemia de células falciformes" o "drepanocitosis" se define en el presente documento que incluye cualquier afección anémica sintomática que resulta de la formación de glóbulos rojos drepanocíticos. Las manifestaciones de la drepanocitosis incluyen: anemia; dolor; y/o disfunción orgánica, tal como insuficiencia renal, retinopatía, síndrome torácico agudo, isquemia, priapismo y accidente cerebrovascular. Como se usa en el presente documento, el término "drepanocitosis" se refiere a una variedad de problemas clínicos relacionados con la anemia de células falciformes, especialmente en los sujetos que son homocigóticos para la sustitución de células falciformes en HbS. Entre las manifestaciones constitucionales denominadas en el presente documento por el uso del término de drepanocitosis están el retraso del crecimiento y desarrollo, un aumento de la tendencia a desarrollar infecciones graves, particularmente debidas a neumococos, marcada alteración de la función esplénica, prevención de la eliminación eficaz de las bacterias circulantes, con infartos recurrentes y eventual destrucción del tejido esplénico. También se incluyen en el término "drepanocitosis" los episodios agudos de dolor musculoesquelético, que afectan principalmente a la columna lumbar, el abdomen y la diáfisis femoral, y que son similares en mecanismo y en intensidad a la enfermedad por descompresión. En los adultos, dichos ataques se manifiestan comúnmente como episodios leves o moderados de corta duración cada algunas semanas o meses intercalados con ataques agonizantes que duran 5 a 7 días que golpean en promedio aproximadamente una vez al año. Entre los acontecimientos conocidos por desencadenar dichas crisis están la acidosis, hipoxia y deshidratación, todos los cuales potencian la polimerización intracelular de HbS (J. H. Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2ª Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1996, páginas 544-545). Como se usa en el presente documento, el término

"talasemia" engloba anemias hereditarias que ocurren debido a mutaciones que afectan la síntesis de la hemoglobina. Así, el término incluye cualquier anemia sintomática resultante de afecciones talasémicas tales como talasemia intensa o β -talasemia, talasemia mayor, talasemia intermedia, α -talasemias tales como enfermedad de la hemoglobina H.

5 Como se usa en el presente documento, "talasemia" se refiere a un trastorno hereditario caracterizado por una producción defectuosa de hemoglobina. Los ejemplos de talasemias incluyen β y una talasemia, las β -talasemias se provocan por una mutación en la cadena de globina beta, y puede ocurrir en una forma mayor o menor. En la forma mayor de la β -talasemia, los niños son normales al nacer, pero desarrollan anemia durante el primer año de vida. La forma leve de la β -talasemia produce glóbulos rojos pequeños y las talasemias se provocan por la delección de un gen o genes de la cadena de globina. Como se usa en el presente documento, las "proteínas anti-formación de glóbulos rojos drepanocíticos" incluyen proteínas que previenen o revierten los acontecimientos patológicos que conducen a la formación de eritrocitos drepanocíticos en las afecciones de células falciformes. Se desvelan células transducidas que se usan para administrar proteínas anti-formación de glóbulos rojos drepanocíticos a un sujeto con una afección hemoglobinopática. Las proteínas anti-formación de glóbulos rojos drepanocíticos también incluyen genes de β -globina mutada que comprenden restos de aminoácidos anti-formación de glóbulos rojos drepanocíticos.

20 También se desvela un método de preparación de un trasplante de células madre hematopoyéticas, que comprende poner en contacto HSPC con una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

25 Se desvelan HSPC para su uso en un método de aumento del alojamiento de células madre y progenitoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende poner en contacto HSPC con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las HSPC, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

30 Las HSPC tratadas se lavan opcionalmente para eliminar sustancialmente los agentes, y posteriormente se administran a un sujeto en necesidad de un aumento en el alojamiento de células madre hematopoyéticas.

35 Se desvela una población de células que comprende HSPC para su uso en métodos de aumento del injerto de células madre en un sujeto en necesidad del mismo que comprende poner en contacto una población de células que comprenden HSPC (por ejemplo, células de la médula ósea, células de sangre periférica y/o glóbulos sanguíneos del cordón umbilical) con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las HSPC, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas, y administrar las HSPC mejoradas al sujeto.

45 Se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética o reconstitución del sistema hematopoyético que comprende identificar un sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética, y administrar al sujeto una cantidad de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las HSPC, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas, tratando así el sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética.

50 Se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético, o un aumento del número de HSPC, que comprende identificar un sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética, y administrar al sujeto una cantidad de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las HSPC, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas, tratando así el sujeto en necesidad de reconstitución hematopoyética.

60 Se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de un trasplante de células madre hematopoyéticas que comprende: seleccionar el sujeto en necesidad de un trasplante de células madre hematopoyéticas y administrar a un sujeto HSPC que se han puesto en contacto con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las HSPC al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas. El sujeto está opcionalmente en necesidad de reconstitución hematopoyética.

De las HSPC para su uso en los métodos desvelados para aumentar el alojamiento o el injerto de HSPC, o para tratar sujetos en necesidad de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético, o para realizar un trasplante de células madre hematopoyéticas, las HSPC se tratan opcionalmente tratadas con una combinación de uno o más agentes que incluyen (i) PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y (ii) un glucocorticoide. Opcionalmente, la combinación incluye (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona. Opcionalmente, la combinación incluye (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona.

Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, la presente invención contempla, en parte, que una de las ventajas de uso de las HSPC mejoradas obtenidas por el método de la invención en los trasplantes de células madres es que se pueden usar menos HSPC en un trasplante debido a que las HSPC mejoradas tienen, por ejemplo, elevado potencial de injerto, alojamiento mejorado y elevada capacidad para la expansión *in vivo* en comparación con HSPC no tratadas.

2. Métodos de tratamiento de tejido isquémico

Se desvelan células desveladas en el presente documento para su uso en métodos de terapia basada en células para tratar tejido isquémico o tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a la isquemia de tejido, que incluyen, pero no se limitan a, alteración, o pérdida de, la función del órgano (incluyendo, sin limitación, alteraciones o pérdida de la función del cerebro, riñón o corazón), calambres, claudicación, insensibilidad, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, decoloración de la piel y gangrena.

El tejido isquémico se puede tratar por un elevado alojamiento de células madre en los sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada vascularización en el sitio de tejido isquémico, reducción de la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico. Por consiguiente, la invención contempla, en parte, que células que tienen estas propiedades terapéuticas serían útiles en el tratamiento de tejido isquémico, o un tejido dañado por isquemia, o el tratamiento o mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico.

Como se usa en el presente documento, los términos "isquemia", "afección isquémica" o "acontecimiento isquémico" significan cualquier disminución o detención en el riego sanguíneo de cualquier célula, tejido, órgano o parte del cuerpo provocado por cualquier constricción, daño u obstrucción de la vasculatura. La isquemia resulta algunas veces de vasoconstricción o trombosis o embolia. La isquemia puede conducir a lesión isquémica directa, daño de tejido debido a muerte celular provocada por el reducido suministro de oxígeno (hipoxia, anoxia), glucosa y nutrientes. "Hipoxia" o una "afección hipóxica" se refieren a una afección en la que una célula, órgano o tejido recibe un suministro insuficiente de oxígeno. "Anoxia" se refiere a una ausencia prácticamente completa de oxígeno en el órgano o tejido, que, si es prolongada, puede dar como resultado la muerte de la célula, órgano o tejido.

"Síntomas asociados a isquemia", "síntomas resultantes de isquemia" o "síntomas provocados por la isquemia" se refiere a síntomas que incluyen, pero no se limitan a: alteración, o pérdida de, la función del órgano (incluyendo, sin limitación, alteraciones o pérdida de la función del cerebro, riñón o corazón), calambres, claudicación, insensibilidad, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, decoloración de la piel y gangrena.

"Lesión de tejido isquémico", "daño de tejido isquémico", "daño de tejido debido a isquemia", "daño de tejido asociado a isquemia", "daño de tejido como resultado de isquemia", "tejido dañado provocado por isquemia" y "tejido dañado isquémico" se refieren a daño morfológico, fisiológico y/o molecular a un órgano o tejido o célula como resultado de un periodo de isquemia.

El sujeto presenta opcionalmente al menos un síntoma de un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia. El sujeto es opcionalmente un humano que tiene o que está en riesgo de tener un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia, por ejemplo, un sujeto que tiene diabetes, enfermedad vascular periférica, tromboangéitís obliterante, vasculitis, enfermedad cardiovascular, enfermedad de las arterias coronarias o insuficiencia cardíaca, o enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular.

También se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento de tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluyen una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

Las células proporcionan opcionalmente terapia al sujeto por el elevado alojamiento de células madre en sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reducción de la

necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumento de la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

5 También se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento o mejora de una lesión de tejido isquémico que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

10 También se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento o mejora de un síntoma asociado a una lesión de tejido isquémico que comprende administrar a un sujeto HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluyen una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

20 Los ejemplos ilustrativos de tejidos que son adecuados para el tratamiento con las composiciones incluyen tejido mesodérmico, tejido endodérmico o tejido ectodérmico. Otros tejidos adecuados para el tratamiento con las composiciones incluyen, pero no se limitan a, tejido de la piel, tejido de músculo esquelético, tejido de músculo cardíaco, tejido de músculo liso, tejido de cartílago, tejido de tendón, tejido de hueso, tejido cerebral, tejido de médula espinal, tejido retiniano, tejido de la córnea, tejido de pulmón, tejido de hígado, tejido de riñón, tejido pancreático, tejido de ovario, tejido testicular, tejido intestinal, tejido de estómago y tejido de vejiga.

25 Se puede tratar cualquier tejido que tenga un riego sanguíneo comprometido y sea isquémico o en riesgo de llegar a ser isquémico usando las HSPC desveladas en el presente documento.

30 Los ejemplos ilustrativos de trastornos genéticos, afecciones sindrómicas, lesiones traumáticas, afecciones crónicas, intervenciones médicas u otras afecciones que provocan o están asociados con isquemia, o aumentan el riesgo de isquemia en un sujeto, o provocan que un sujeto presente cada vez más síntomas de isquemia, y así, adecuados para el tratamiento o mejora usando los métodos de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome disneico agudo (SDA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto del cartílago articular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura de hueso, fractura de hueso, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger, quemaduras, cáncer, enfermedad cardiovascular, daño al cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño al tejido conjuntivo, contusión, enfermedad de las arterias coronarias (EAC), isquemia crítica de las extremidades (ICE), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, curación retardada de úlceras, curación retardada de heridas, diabetes (tipo I y tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, enfermedad injerto contra huésped, congelación, telangiectasia hemorrágica hereditaria, enfermedad vascular isquémica, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión isquémica-por reperfusión, laceración, enfermedad de la arteria coronaria principal izquierda, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia orgánica, osteoartritis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad de las arterias periféricas, isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, pre-cáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de la remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, septicemia, úlceras de la piel, trasplante de órganos sólidos, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, quiste subcontral del hueso, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia de tejido, ataque isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular del riñón, afecciones inflamatorias vasculares, síndrome de von Hippel-Lindau y

55 heridas en tejidos u órganos.

60 Otros ejemplos ilustrativos de trastornos genéticos, afecciones sindrómicas, lesiones traumáticas, afecciones crónicas, intervenciones médicas, u otras afecciones que provocan o están asociadas con isquemia, o aumentan el riesgo de isquemia en un sujeto, o provocan que un sujeto presente cada vez más síntomas de isquemia adecuados para el tratamiento o mejora usando los métodos de la presente invención, incluyen, isquemia resultante de cirugía, quimioterapia, radioterapia, o célula, tejido o trasplante de órganos o injerto.

65 Las HSPC desveladas en el presente documento son adecuadas para su uso en el tratamiento de isquemia cerebrovascular, isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades (ICE), isquemia miocárdica (especialmente isquemia miocárdica crónica), cardiomiopatía isquémica, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia intestinal y similares.

Las composiciones de células terapéuticas desveladas en el presente documento se pueden usar para tratar un tejido isquémico en el que es conveniente aumentar la circulación sanguínea, el suministro de oxígeno, el suministro de glucosa o el suministro de nutrientes al tejido.

5

3. HSPC expandidas

La invención contempla además que las HSPC mejoradas obtenidas por el método de la invención no se expanden *ex vivo* o *in vitro*. En realizaciones particulares, se obtiene una población sin expandir de HSPC, la población de HSPC se trata *ex vivo* según el protocolo proporcionado en el presente documento para obtener HSPC mejoradas, y las HSPC mejoradas se pueden lavar para retirar el (los) agente(s) de tratamiento. En algunas realizaciones, se obtienen HSPC de un donante, que incluye sangre del cordón, y no se expanden antes o después del tratamiento de las HSPC.

10

15

En diversas realizaciones, las HSPC usadas en el método de la invención no se cultivan antes del tratamiento con uno o más agentes, o combinaciones de agentes como se define en las reivindicaciones, *ex vivo*. En algunas realizaciones, las HSPC se cultivan durante menos de aproximadamente 24 horas. En otras realizaciones, las HSPC se cultivan durante menos de aproximadamente 12 horas, 10 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, o dos horas.

20

25

30

En otras realizaciones, las HSPC usadas en el método de la invención se expanden antes del tratamiento de las HSPC con agentes para obtener HSPC mejoradas. Las HSPC, si se obtienen de sangre del cordón, médula ósea, sangre periférica, gelatina de Wharton, sangre placentaria u otra fuente, se pueden cultivar o expandir en cualquier medio adecuado, comercialmente disponible o definido a medida, con o sin suero, según se desee (véase, por ejemplo, Hartshorn et al., *Cell Technology for Cell Products*, páginas 221-224, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, 2007). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el medio sin suero puede utilizar albúmina y/o transferrina, que se ha mostrado que es útil para el crecimiento y la expansión de células CD34⁺ en medio sin suero. Por tanto, se pueden incluir citocinas, tales como el ligando Flt-3, factor de célula madre (SCF) y trombopoyetina (TPO), entre otros. También se pueden cultivar HSPC en recipientes tales como biorreactores (véase, por ejemplo, Liu et al., *Journal of Biotechnology* 124:592-601, 2006). Un medio adecuado para la expansión *ex vivo* de HSPC también puede comprender células de sostén, tales como células del estroma (por ejemplo, células del estroma linforreticular), que se pueden obtener, por ejemplo, de la desagregación de tejido linfoide, y que se ha mostrado que soportan el mantenimiento *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, el crecimiento y la diferenciación de células madre y progenitoras hematopoyéticas, así como su descendencia.

35

40

En diversas realizaciones, las HSPC mejoradas obtenidas por los métodos de la invención son una población heterogénea de células que incluyen médula ósea completa, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas y la descendencia de las células madre y progenitoras hematopoyéticas, que incluyen granulocitos (por ejemplo, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrocitos (por ejemplo, reticulocitos, eritrocitos), trombocitos (por ejemplo, megacarioblastos, megacariocitos productores de plaquetas, plaquetas) y monocitos (por ejemplo, monocitos, macrófagos).

4. Administración de HSPC y composiciones de las mismas

45

50

Se desvelan HSPC y composiciones para su uso en los métodos que comprenden la administración de HSPC tratadas a un sujeto en necesidad de las mismas. Los métodos adecuados para administrar las poblaciones de células usadas en los métodos descritos en el presente documento incluyen administración parenteral, que incluye, pero no se limita a, métodos de administración intravascular, tales como administración intravenosa e intrarterial. Los métodos ilustrativos adicionales para administrar las células desveladas en el presente documento incluyen inyección intramuscular, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión.

55

60

65

Se desvelan HSPC para su uso en un método de aumento del alojamiento o el injerto de HSPC, cuyo uso comprende la administración parenteral de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas. En el contexto de la presente invención se desvelan HSPC para su uso en un método de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético, o para realizar un trasplante de células madre hematopoyéticas, cuyo uso comprende la administración parenteral de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluye una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

Las HSPC se administran o infunden opcionalmente a un sujeto por vía intravenosa.

Los usos desvelados en el contexto de la presente invención para aumentar el alojamiento o el injerto de HSPC, o para tratar sujetos en necesidad de reconstitución hematopoyética, la reconstitución del sistema hematopoyético, o para realizar un trasplante de células madre hematopoyéticas, comprenden administrar por vía intravenosa o infundir HSPC tratadas con una combinación de uno o más agentes que incluyen (i) PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y (ii) un glucocorticoide. En realizaciones más particulares, los métodos comprenden administrar por vía intravenosa o infundir HSPC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona. Los usos comprenden opcionalmente administrar por vía intravenosa o infundir HSPC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona.

La composición se puede administrar a un individuo que tiene isquemia, tejido isquémico, o al menos un síntoma de isquemia. El sitio de administración está opcionalmente próximo o es el más próximo al sitio previsto de actividad, es decir, cerca del sitio de isquemia de tejido. En los casos en los que un sujeto padece isquemia global, se prefiere una administración sistémica, tal como administración intravenosa. Sin pretender quedar ligado por mecanismo, cuando las composiciones terapéuticas se administran, las HSPC migran o se alojan en el tejido isquémico en respuesta a factores quimiotácticos producidos debido a la lesión para efectuar el tratamiento de tejido isquémico o el tratamiento y la mejora de al menos un síntoma asociado al tejido isquémico.

Las HSPC se pueden inyectar directamente en el área de isquemia, o las células madre se pueden infundir en una arteria que suministra al área de isquemia de tejido. Donde el sujeto tiene un vaso totalmente ocluido que normalmente suministraría el área del tejido isquémico, la arteria seleccionada para la infusión es preferentemente un vaso que proporciona flujo colateral al tejido isquémico en la distribución del vaso totalmente ocluido.

Las HSPC y composiciones terapéuticas obtenidas por el método de la invención se pueden insertar en un dispositivo de administración que facilita la introducción por inyección o implantación en los sujetos. Dichos dispositivos de administración pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una realización, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la que se pueden introducir las células de la invención en el sujeto en una ubicación deseada. En una realización particular, las células obtenidas por el método de la invención se formulan para administración en un vaso sanguíneo por un catéter (donde el término "catéter" pretende incluir cualquiera de los diversos sistemas de tipo tubo para la administración de sustancias a un vaso sanguíneo).

También se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento de un tejido isquémico, o un tejido dañado por isquemia, que comprende la administración parenteral de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluyen una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

También se desvelan HSPC para su uso en un método de tratamiento o mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende la administración parenteral de HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluyen una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

Las HSPC se administran opcionalmente por vía intravenosa o por inyección directa al sitio isquémico.

El uso de las HSPC en los métodos descritos en el presente documento para tratar o mejorar la isquemia o al menos un síntoma de isquemia puede comprender administrar por vía intravenosa o inyectar directamente HSPC tratadas con una combinación de uno o más agentes que incluyen (i) PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y (ii) un glucocorticoide. El uso comprende opcionalmente administrar por vía intravenosa o infundir HSPC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona. El uso comprende opcionalmente administrar por vía intravenosa o infundir HSPC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetilPGE₂ y (ii) medrisona.

La composición se puede administrar opcionalmente por vía tópica a un sitio de daño de tejido isquémico, tal como, por ejemplo, la superficie de una herida, por ejemplo, una herida que no cicatriza, una úlcera, una quemadura o congelación.

Las composiciones se pueden formular especialmente para administración en forma sólida o líquida, que incluyen las adaptadas para lo siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida como parte de un injerto celular, armazones biocompatibles, etc. Se desvela que un armazón biocompatible o injerto

promueve la reparación, sustitución y/o regeneración de un tejido u órgano dañado, lesionado o enfermo, por ejemplo, un tejido isquémico.

5 También se desvelan HPSC para su uso en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de las HPSC desveladas en el presente documento que comprende proporcionar un armazón biocompatible o injerto de células que comprenden HPSC. Como se usa en el presente documento, el término "armazón biocompatible" o "injerto de células" se refiere a una estructura natural y/o sintético biocompatible que comprende una o más composiciones basadas en células, células, tejidos, polímeros, polinucleótidos, retículas y/o matrices que se inyecta, aplica a la superficie de, o se injerta dentro de un paciente o sujeto que es adecuado para dirigir o atraer una composición basada en células para reparar, regenerar o sustituir una célula, tejido u órgano *in vivo*.

15 Un implante comprende opcionalmente una matriz biocompatible que se puede moldear en cualquier forma adecuada y tiene especialmente funciones importantes para preparar tejidos en una forma tridimensional que tiene una cierta profundidad o altura o una forma de tipo hoja plana para aplicaciones a heridas dérmicas. La ciencia de los biomateriales es un campo establecido y en evolución (Takayama et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, pg 209-218; Saltmann et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 221-236; Hubbell et al, Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 237-250; Thomson et al, Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 251-262; Pachence et al, Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 263-278).

25 Los químicos han desarrollado métodos de síntesis de armazones biocompatibles que comprenden polímeros para dirigir y modular el crecimiento celular *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Las propiedades físicas de los polímeros se pueden modular para crear matrices sólidas y líquidas de concentraciones y viscosidades específicas. Algunos polímeros son estables *in vivo* y permanecerán en el cuerpo de un paciente durante hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o más años. Otros polímeros también son biodegradables, resorbiéndose a una tasa fija con el tiempo para permitir la sustitución por proteínas de la matriz extracelular recién sintetizadas. La resorción puede ocurrir en el plazo de días a semanas o meses tras la implantación (Pachence et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, editor Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 263-278).

35 Un armazón biocompatible comprende opcionalmente un material bioabsorbible. Un vehículo poroso está hecho preferentemente de un componente o una combinación de múltiples componentes seleccionados del grupo que consiste en colágeno, derivados de colágeno, ácido hialurónico, hialuronatos, quitosano, derivados de quitosano, polirotaxano, derivados de polirotaxano, quitina, derivados de quitina, gelatina, fibronectina, heparina, laminina y alginato de calcio; en donde un miembro de soporte se fabrica de un componente o una combinación de múltiples componentes seleccionados del grupo que consiste en ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, copolímero de ácido poliláctico-policaprolactona y copolímero de ácido poliglicólico-policaprolactona (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 5.077.049 y 5.42.033, y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº 2006/0121085).

45 El armazón biocompatible o injerto de células comprende un material líquido biocompatible viscoso. El líquido biocompatible es capaz de gelificar a temperatura corporal y se selecciona del grupo que consiste en alginato, colágeno, fibrina, hialina o plasma. El material líquido biocompatible viscoso también se puede combinar con una matriz tridimensional maleable, capaz de llenar un defecto de tejido irregular. La matriz es un material que incluye, pero no se limita a, ácido poliglicólico-poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliláctico o materia de tipo sutura.

50 Los armazones biocompatibles o injertos de células que comprenden matrices se pueden moldear en formas deseadas (por ejemplo, estructuras bidimensionales o tridimensionales) propicias para o que facilitan el desarrollo de células, tejidos y/u órganos. El implante se puede formar de material polimérico, que tiene fibras tales como una malla o esponja. Dicha estructura proporciona área suficiente sobre la que pueden crecer y proliferar las células. Deseablemente, las matrices de los armazones o injertos de células son biodegradables con el tiempo, de manera que se absorberán en la materia animal a medida que se desarrolla. Los polímeros adecuados pueden ser homopolímeros o heteropolímeros y se pueden formar a partir de monómeros que incluyen, pero no se limitan a, ácido glicólico, ácido láctico, fumarato de propilo, caprolactona y similares. Otro material polimérico adecuado puede incluir una proteína, polisacárido, polihidroxiácido, poliortoéster, polianhídrido, polifosfaceno o un polímero sintético, particularmente un polímero biodegradable, o cualquier combinación de los mismos.

60 Los armazones de tipo hoja e injertos proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para tejidos dérmicos, membranas para procedimiento de cobertura de la raíz dental, tejidos membranosos (por ejemplo, duramadre), huesos planos (por ejemplo, cráneo, hueso de mama) y similares. Los implantes e injertos tubulares proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para arterias, venas, uréteres, uretras, nervios, huesos largos (por ejemplo, fémur, tibia, húmero, radio, cúbito, metacarpianos, metatarsiano, etc.) y similares.

65 Otros implantes e injertos tridimensionales proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para trasplantes de órganos (por ejemplo, hígado, pulmón, piel, corazón, páncreas, etc.), remodelación de hueso o

reparación de todos los tipos de huesos, implantes dentales, o para injertos de músculo, tendón, ligamento y cartílago.

También se desvela un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HSPC para su uso en un método de tratamiento o de mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HSPC contactadas con uno o más agentes que aumentan la expresión génica de CXCR4 en las células, que incluyen una combinación de un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión génica de CXCR4 en las células al menos 30, 40, 50, 60, 70 u 80 veces en comparación con el nivel de la expresión génica de CXCR4 en las células no contactadas.

El uso de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HSPC para tratar o mejorar al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia comprende opcionalmente la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HSPC tratadas con una combinación de uno o más agentes que incluyen (i) PGE₂, dmPGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂ o 8- iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂ y (ii) un glucocorticoide. El uso comprende opcionalmente la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HPSC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona. El uso comprende opcionalmente la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende HPSC tratadas con (i) PGE₂ o 16,16-dimetil PGE₂ y (ii) medrisona.

F. Composiciones listas para administración de la invención

Las composiciones de células tratadas obtenidas por el método de la invención son estériles, y son adecuadas y están listas para administración (es decir, se pueden administrar sin ningún procesamiento adicional) a pacientes humanos. En algunas realizaciones, la composición terapéutica está lista para infusión en un paciente. Como se usa en el presente documento, los términos "listo para administración" o "listo para infusión" se refieren a una composición basada en células obtenidas por el método de la invención que no requiere tratamiento o manipulaciones adicionales antes del trasplante o administración a un sujeto.

Las composiciones estériles terapéuticamente aceptables adecuadas para administración a un paciente pueden comprender uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, medio de cultivo celular), u otros componentes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición terapéutica. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones terapéuticas (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed. 1985)).

En realizaciones particulares, las composiciones de células terapéuticas que comprenden células madre y/o progenitoras obtenidas por el método de la invención comprenden un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Una composición terapéutica que comprende una composición basada en células puede ser administrada por separado por métodos de administración enteral o parenteral, o en combinación con otros compuestos adecuados para efectuar los objetivos de tratamiento deseados.

El vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable debe ser de pureza suficientemente alta y de toxicidad suficientemente baja para convertirlo en adecuado para administración al sujeto humano que está tratándose. Además debe mantener o aumentar la estabilidad de la composición terapéutica. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta el modo de administración planeado, para proporcionar la masa deseada, consistencia, etc., cuando se combina con otros componentes de la composición terapéutica de la invención. Por ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitación, un aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.), una carga (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos, hidrogenofosfato de calcio, etc.), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato sódico, etc.), un disgregante (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.), o un agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares.

Dichas disoluciones de vehículo también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a una disolución o líquido cuya constitución química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Los ejemplos de tampones previstos por la invención incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), disolución de Ringer, 5 % de dextrosa en agua (D5W), solución salina normal/fisiológica (0,9 % de NaCl).

Estos vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la composición terapéutica de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10. Como tal, el agente de tamponamiento puede ser nada menos que aproximadamente 5 % en una base p/p de la composición total. También se pueden incluir electrolitos tales como, pero no se limitan a, cloruro sódico y cloruro de potasio en la composición terapéutica.

En un aspecto, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10. Alternativamente, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 9, o desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 8. En otra realización, la composición terapéutica comprende un tampón que tiene un pH en uno de dichos intervalos de pH. En otra realización, la composición terapéutica obtenida por el método de la presente invención tiene un pH de aproximadamente 7. Alternativamente, la composición terapéutica tiene un pH en un intervalo desde aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4. En otra realización adicional, la composición terapéutica tiene un pH de aproximadamente 7,4.

La composición estéril obtenida por el método de la invención puede ser una disolución estéril o suspensión en un medio no tóxico farmacéuticamente aceptable. El término "suspensión", como se usa en el presente documento, se puede referir a condiciones no adherentes en las que las células no se unen a un soporte sólido. Por ejemplo, las células mantenidas en la suspensión se pueden agitar y no se adhieren a un soporte, tal como una placa de cultivo.

Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la que una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no sedimenta rápidamente. Se puede preparar una suspensión usando un vehículo tal como un medio líquido, que incluye una disolución. En realizaciones particulares, la composición terapéutica es una suspensión, donde las células madre y/o progenitoras se dispersan dentro de un medio líquido aceptable o disolución, por ejemplo, solución salina o medio libre suero, y no se unen a un soporte sólido. En la vida diaria, las suspensiones más comunes son las de sólidos en agua líquida. Entre los diluyentes aceptables, por ejemplo, vehículos y disolventes, que se pueden emplear están el agua, la disolución de Ringer, disolución de cloruro sódico isotónico (solución salina) y medio de cultivo celular libre de suero. En algunas realizaciones, se emplean disoluciones hipertónicas en la preparación de suspensiones. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para administración parenteral, vehículos particularmente adecuados consisten en disoluciones, preferentemente disoluciones aceitosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. En algunas realizaciones, la disolución para infusión es isotónica para los tejidos del sujeto. En algunas realizaciones, la disolución para infusión es hipertónica para los tejidos del sujeto.

El vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyentes y otros componentes que comprenden la composición terapéutica lista para administración obtenida por el método de la invención se obtienen de los reactivos de calidad U.S. Pharmaceutical que permitirán que se use la composición terapéutica en las pautas posológicas clínicas. Normalmente, estos reactivos acabados, que incluyen cualquier medio, disolución, u otros vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se esterilizan de un modo convencional en la técnica, tal como esterilización por filtración, y se prueban para diversos contaminantes no deseados, tales como contaminación por micoplasmas, endotoxinas o virus, antes de uso. El vehículo farmacéuticamente aceptable en una realización está sustancialmente libre de proteínas naturales de origen humano o animal, y es adecuado para conservar la población de células de la composición terapéutica, que incluye madre y progenitoras hematopoyéticas. La composición terapéutica pretende ser administrada a un paciente humano, y así está sustancialmente libre de componentes de cultivo celular tales como albúmina de suero bovino, suero de caballo y suero bovino fetal.

La invención también contempla, en parte, el uso de un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable en composiciones particulares y/o cultivos de la presente invención. Dichas composiciones son adecuadas para administración a sujetos humanos. En términos generales, cualquier medio que respalde el mantenimiento, el crecimiento y/o la salud de las células reprogramadas y/o programadas deseadas de la invención es adecuado para su uso como un medio de cultivo celular farmacéutico. En realizaciones particulares, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio libre de suero.

La composición terapéutica puede comprender medio libre suero adecuado para conservar la población de células que comprenden la composición. En diversas realizaciones, el medio libre suero está libre de animal y puede estar opcionalmente libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. Medio "libre de animal" se refiere a medio en donde los componentes derivan de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes sustituyen las proteínas animales nativas en medio libre de animal y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, de planta o microbianas. El medio libre de proteína, a diferencia, se define como sustancialmente libre de proteína.

El medio libre de suero empleado en la presente invención es una formulación adecuada para su uso en protocolos y productos terapéuticos humanos. Un medio libre de suero es QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), como se describe en la patente de EE. UU. N° 5.945.337. QBSF-60 está optimizado con componentes de grado U.S. Pharmaceutical y

5 está compuesto por el medio basal IMDM más L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, albúmina de suero humana de calidad inyectable (4 mg/ml) (Alpha Therapeutic Corporation), transferrina humana parcialmente saturada de hierro (300 µg/ml) (Sigma Chemical Corporation o Bayer Corporation) e insulina de sodio recombinante humana (0,48 U/ml) (Sigma). Otro medios libres de suero conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a: medios de cultivo libres de suero Catálogo StemPro-34 de Life Technologies; Capmany, et al., Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34+ cells: effects of FLT3-L and MIP-1α on in vitro expansion of hematopoietic progenitor cells, *Haematologica* 84:675-682 (1999); Daley, J P, et al., Ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free StemProTM-34 Medium, *Focus* 18(3):62-67; información del catálogo de Life Technologies sobre medio de cultivo libre de suero AIM V; información del catálogo de BioWhittaker sobre medio de cultivo libre de suero X-VIVO 10; documento de patente 5.397.706 titulado Serum-free basal and culture medium for hematopoietic and leukemia cells; no cell proliferation; Kurtzberg *et al.*, 18:153-4 (2000); Kurtzberg et al., *Exp Hematol* 26(4):288-98 (April 1998).

15 Un experto habitual en la técnica apreciaría que el ejemplo anterior de medio es ilustrativo y de ninguna forma limita la formulación de medios adecuados para su uso en el método de la presente invención y que existen muchos de dichos medios conocidos y que están disponibles para los expertos en la técnica.

20 En diversas realizaciones, la composición terapéutica comprende una disolución estéril de albúmina de suero humano (HSA), tal como 5 % de HSA y dextrano de bajo peso molecular (LMW).

La composición terapéutica está sustancialmente libre de contaminación por micoplasmas, endotoxina y microbiana. En realizaciones particulares, la composición terapéutica obtenida por el método de la invención contiene menos de aproximadamente 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,05 µg/ml de albúmina de suero bovino.

25 Por "sustancialmente libre" con respecto a la endotoxina se indica que existe menos endotoxina por dosis de células de lo que está permitido por la FDA para un producto biológico, que es una endotoxina total de 5 UE/kg de peso corporal por día, que para una persona promedio de 70 kg es 350 UE por dosis total de células.

30 Con respecto a la contaminación por micoplasmas y microbiana, "sustancialmente libre" como se usa en el presente documento significa una lectura negativa para las pruebas conocidas, en general, aceptadas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la contaminación por micoplasmas se determina subcultivando una muestra de la composición terapéutica en medio de caldo y distribuida sobre agar placas en el día 1, 3, 7 y 14 a 37 °C con controles positivos y negativos apropiados. Se compara microscópicamente el aspecto de la muestra, a 100×, con la del control positivo y negativo. Además, la inoculación de un cultivo celular indicador se incuba durante 3 y 5 días y se examina a 600× para la presencia de micoplasmas por microscopía de epifluorescencia usando un fluorocromo que se une a ADN. La muestra se considera satisfactoria si el procedimiento de medio de agar y/o de caldo y el procedimiento de cultivo celular indicador no muestran evidencia de contaminación por micoplasmas.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNm DE CXCR4 EN HSPC TRATADAS

45 CXCR4 qPCR usando la plataforma Fluidigm

Se realizó la cuantificación de transcritos de PCR en tiempo real de la expresión génica de células CD34⁺ derivadas de la sangre del cordón umbilical humana tratadas *ex vivo* (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) usando el sistema de microfluídica BioMark Dynamic Array (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA, EE. UU.).

55 Se trataron células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón o sangre periférica movilizada en medio de expansión libre suero (SFEM; por ejemplo, StemSpan® de StemCell Technologies, Inc.) durante cuatro horas a 37 °C, 5 % de CO₂ con agonista de la vía de la prostaglandina 10 uM solo o en combinación con 10 uM de un glucocorticoide. Los agonistas de la vía de la prostaglandina incluyeron 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂), 20-etil PGE₂ (ePGE₂), 15(S)-15-metil PGE₂ (mPGE₂) y PGE₂. Los glucocorticoides incluyeron hidrocortisona, dexametasona, medrisona, alclometasona o triamcinolona. Después del tratamiento, se lavaron las células con SFEM y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos.

60 Entonces se aisló ARN total de células tratadas usando el kit de aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se retrotranscribió ADN complementario (ADNc) a partir de 50 ng de ARN total aislado usando el kit de retrotranscripción de ADNc de alta capacidad (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.).

65 Se preamplificó el ADNc para genes diana específicos (96) usando una mezcla 200 nM de ensayos TaqMan de Applied Biosystems de 96 genes específicos (véase la Tabla1), que incluye 3 genes de control de referencia

5 (GAPDH, HPRT1 y QARS) usando el protocolo del kit TaqMan PreAmp Master Mix (Life Technologies). Se realizó la amplificación diana específica (STA) de ADNc usando 14 ciclos de amplificación con las condiciones de ciclado estándar usando el protocolo del fabricante. Para las muestras, la mezcla de reacción contuvo 3,0 µl de Gene Expression Master Mix (Life Tech.), 0,3 µL de tampón de carga de muestra (Fluidigm), 1,5 µl de ADNc de STA diluido (1:5 de nH₂O estéril) y 1,2 µl de diH₂O estéril para carga en las entradas de muestra de la matriz dinámica 96.96 (Fluidigm).

10 Las muestras se desplazaron por duplicado, desde 5 hasta 9 pocillos. La mezcla de reacción contuvo 2,5 µl de ensayos Taqman específicos de gen (20X) y 2,5 µl de tampón de carga de ensayo (Fluidigm) para la carga en las entradas de ensayo en la matriz dinámica 96.96 (Fluidigm). Se cargaron matrices dinámicas 96.96 usando un NanoFlex IFC Controller HX (Fluidigm) y se realizaron reacciones en tiempo real usando un sistema de PCR en tiempo real de BioMark (Fluidigm).

15 Los resultados se analizaron usando el software de análisis por PCR en tiempo real de BioMark. Se calcularon los Ct promedio a partir de los duplicados de muestra y se calcularon los delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) usando la media de 3 genes de referencia (GAPDH, HPRT1, QARS) contra una muestra de solo vehículo. Se excluyeron de los cálculos los Ct por encima de 28. Los resultados se presentaron en un gráfico de barras gráfico de Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.) que muestra el cambio en veces promedio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para CXCR4. Las barras de error representan +/- la desviación estándar (DE) de las mediciones por duplicado.

20 Resultados

25 Se observó un aumento en la expresión de ARNm de CXCR4 en células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM (22 veces), o una combinación de dmPGE₂ 10 µM y glucocorticoide 10 µM (50 a 61 veces), cuando se comparó con células tratadas con DMSO. Se detectó un aumento sinérgico en los niveles de ARNm de CXCR4⁺ tras un tratamiento de combinación de dmPGE₂ 10 µM y 10µM de uno cualquiera de cinco glucocorticoides diferentes (Figura 1). Los glucocorticoides actúan sinérgicamente con dmPGE₂ para aumentar la expresión del gen CXCR4.

30 También se observó un aumento sinérgico similar en la expresión de ARNm de CXCR4 en células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas en SFEM durante 4 horas con otros agonistas de la vía de la prostaglandina, PGE₂ 10 µM (aumento de 8 a 61 veces) (Figura 2A), 15,15-metil PGE₂ 10 µM (aumento de 16 a 50 veces) (Figura 2B) y 20-etil PGE₂ 10 µM (aumento de 16 a 55 veces) (Figura 2C) cuando se combina con un glucocorticoide en comparación con células tratadas con DMSO. Los glucocorticoides también actúan sinérgicamente con otros agonistas de la vía de la prostaglandina para aumentar la expresión del gen CXCR4.

35

Tabla 1: Ensayos TaqMan de Applied Biosystems

Gen	ID del ensayo	Gen	ID del ensayo	Gen	ID del ensayo	Gen	ID del ensayo
ANGPT 1	Hs00375822_m1	CXCL6	Hs0237017_m1	PROM1	Hs01009250_m1	BMP4	Hs00370078_m1
ANGPT 2	Hs01048042_m1	IKKB	Hs00233287_m1	PECAM 1	Hs00169777_m1	TIE1	Hs00178500_m1
AREG	Hs00950669_m1	CASP3	Hs00234387_m1	JAG1	Hs01070032_m1	GAPDH	Hs99999905_m1
ARNT	Hs00231048_m1	CREM	Hs01590456_m1	CTGF	Hs00170014_m1	CD40L	Hs00163934_m1
BAX	Hs00180269_m1	HGF	Hs00300159_m1	SOD2	Hs00167309_m1	PDGFB	Hs00966522_m1
THBS1	Hs00962908_m1	DUSP 4	Hs01027785_m1	CYR61	Hs00155479_m1	CXCL1	Hs00236937_m1
TEK	Hs00945146_m1	CFLAR	Hs01116280_m1	IGF2	Hs00171254_m1	CXCR4	Hs00976734_m1
MMP2	Hs01548727_m1	FGF2	Hs00266645_m1	PTGS2	Hs00153133_m1	RAC2	Hs01032884_m1
PDGFR	Hs01019589_m1	NR4A 2	Hs00428691_m1	TERT	Hs00972656_m1	TGFB1	Hs00998133_m1
MMP9	Hs00234579_m1	CD40	Hs00374176_m1	CD44	Hs01075861_m1	HMGB1	Hs01923466_g1
NOS3	Hs01574659_m1	KDR	Hs00911700_m1	ITGB1	Hs00559595_m1	CTNNB 1	Hs00170025_m1
CSF3	Hs00357085_g1	IL8	Hs00174103_m1	PLAUR	Hs00182181_m1	DUSP4	Hs00175210_m1
BCL2	Hs00608023_m1	BMP2	Hs00154192_m1	CSF1	Hs00174164_m1	AKT1	Hs00178289_m1
VEGFA	Hs00900055_m1	ICAM1	Hs00164932_m1	CXCL3	Hs00171061_m1	CASP8	Hs01018151_m1
CD34	Hs00990732_m1	IL1A	Hs00174092_m1	CD47	Hs00179953_m1	CCL7	Hs00171147_m1
HIF1A	Hs00936371_m1	EDN1	Hs00174961_m1	S1PR1	Hs00173499_m1	CCR1	Hs00174298_m1
SMAD4	Hs00929647_m1	FLT1	Hs01052961_m1	GEM	Hs00738924_m1	CD151	Hs00388381_m1
PGF	Hs01119262_m1	NFKB1	Hs00765730_m1	SMAD2	Hs00183425_m1	CXCR7	Hs00604567_m1
TGFB3	Hs01086000_m1	CXCL5	Hs00171085_m1	CCND1	Hs00765553_m1	HBEGF	Hs00181813_m1
NR3C1	Hs00353740_m1	TNF	Hs00174128_m1	ITGAL	Hs00158218_m1	CXCR2	Hs01011557_m1
STAT1	Hs01013996_m1	ITGA4	Hs00168433_m1	LIF	Hs00171455_m1	RASA1	Hs00243115_m1
CDH5	Hs00901463_m1	HPRT1	Hs01003267_m1	EFNB2	Hs00187950_m1	RGS16	Hs00161399_m1
CXCL2	Hs00601975_m1	ITGA5	Hs01547673_m1	CXCL12	Hs00171022_m1	TIMP1	Hs00171558_m1
FOSL2	Hs00232013_m1	ITGB2	Hs00164957_m1	QARS	Hs00192550_m1	TIMP2	Hs00234278_m1

CXCR4 qPCR usando el StepOnePlus de Applied Biosystems

Se realizó la cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real a partir de células CD34⁺ del cordón tratadas ex vivo (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) y células CD34⁺ de sangre periférica movilizada (All Cells, LLC, Emoryville, CA, EE. UU.) usando el sistema StepOne Plus de Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) (véase la Figura 3). Se trataron las células CD34⁺ en SFEM durante cuatro horas a 37 °C, 5 % de CO₂ con 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂) 10 uM sola o en combinación con medrisona 10 uM. Después de tratamiento, se lavaron las células con SFEM y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos.

Entonces se aisló ARN total de las células tratadas usando el kit de aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Se retrotranscribió ADN complementario (ADNc) a partir de 50 ng de ARN total aislado usando el kit de retrotranscripción de ADNc de alta capacidad (Life Technologies).

Se realizó análisis por PCR en tiempo real en las muestras de ADNc por duplicado. La mezcla de reacción contuvo 1 µl de ensayo Taqman específico de gen (20X) y 10 µl de Gene Expression Master Mix (Life Technologies) conteniendo el volumen restante 9 µl de ADNc largo contenido y diH₂O estéril.

Se analizaron los resultados de CXCR4 (ensayo de la Tabla 1) usando el software de análisis StepOne de Applied Biosystems v2.1. Se calcularon los Ct promedio a partir de los duplicados de muestra y se calcularon los delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) resultados de GAPDH (ensayo de la Tabla 1) como gen de referencia contra una muestra de solo vehículo. Los resultados se presentaron en un gráfico de barras gráfico de Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE. UU.) que muestra el cambio en veces promedio ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para CXCR4. Las barras de error representan +/- la desviación estándar (DE) de las mediciones duplicadas (véanse las Figuras 1 - 3, 5 y 6).

Resultados

Se observó un aumento similar en la expresión de ARNm de CXCR4 en tanto células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón como células CD34⁺ aisladas de sangre periférica movilizada (aumento de 22 y 27 veces, respectivamente) después de un tratamiento de 4 horas en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM. Se detectó un aumento sinérgico similar en ARNm de CXCR4 en tanto células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón como células CD34⁺ aisladas de sangre periférica movilizada (60 y 59 veces, respectivamente) después de un tratamiento de combinación de 4 horas en SFEM con un agonista de la vía de la prostaglandina (dmPGE₂) y un glucocorticoide (medrisona) (Figura 3). Las células CD34⁺ responden similarmente a cualquier tratamiento independientemente de la fuente de origen.

Ejemplo 2

EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS CD34⁺ CON UNA COMBINACIÓN DE DMPGE₂ Y MEDRISONA DA COMO RESULTADO LA ELEVADA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA SUPERFICIE CXCR4

Análisis de la expresión superficial de CXCR4 sobre SC y SP CD34+ congeladas

Se trataron células de sangre del cordón (SC) CD34⁺ (Stem Cell Technologies) y células de sangre periférica movilizada (SPm) CD34⁺ (All Cells) en SFEM durante 2 y 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂ con dmPGE₂ 10 µM, dmPGE₂ y medrisona, o DMSO como control. Después del tratamiento, las células se lavaron con SFEM y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Entonces se resuspendieron las células en SFEM para incubación a 37 °C, 5 % de CO₂ durante una diversa cantidad de tiempo.

Se trataron células SPm y SC CD34⁺ en SFEM durante 2 o 4 horas con dmPGE₂, dmPGE₂ y medrisona, o DMSO, y entonces se evaluaron las células para la expresión de proteínas de la superficie CXCR4 en diferentes momentos de tiempo durante y después del tratamiento (Tabla 2). Para medir los niveles de CXCR4, se centrifugaron células tratadas a 300 g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio de tinción que contenía Linaje cocktail 1-FITC, CD34-APC, CXCR4(CD184)-PE, y se incubaron sobre hielo durante 20 minutos. Entonces se añadió medio de tinción nuevo a las células para lavar las células de cualquier anticuerpo no unido residual, se centrifugaron las células a 300 g durante 10 minutos, y este procedimiento de lavado se repitió dos veces. Las células teñidas se adquirieron en un citómetro de flujo Guava EasyCyte 8HT y se realizó el análisis usando el paquete de software de FloJo (Treestar).

Tabla 2. Tratamientos y momentos de tiempo usados para el análisis superficial de la proteína CXCR4

Tiempo	Tratamientos		
2 h Tx	DMSO	dmPGE2 10 uM	dmPGE2 10uM + medrisona 10 uM
2 h Tx + 2 h a 37 °C			
2 h Tx + 4 h a 37 °C			
4 h Tx			

(continuación)

Tiempo	Tratamientos	
4 h Tx + 2 h a 37 °C		
4 h Tx+ 4 h a 37 °C		

Resultados

5 Se observó un aumento en la expresión de ARN de CXCR4 en células CD34⁺ de sangre del cordón o células de SPM tratadas en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM y dmPGE₂ y medrisona durante 2 y 4 horas a 37 °C cuando se compara con células tratadas con DMSO. Se obtuvo el porcentaje más alto de células CXCR4⁺ 2 horas después de un tratamiento de 4 horas con dmPGE₂ y medrisona (Figuras 5 y 6) para ambos tipos de células independientemente de la fuente de la célula. Para células CD34⁺ de sangre periférica movilizada, el 75 % de las células expresaron CXCR4⁺ en comparación con 8 % para el control (Figura 5). Para células CD34⁺ de sangre del
10 cordón, el 25 % de las células expresaron CXCR4 después del tratamiento con dmPGE₂ y medrisona en comparación con 3-6 % para las muestras de control (Figura 6).

También se probaron células CD34⁺ de médula ósea humana para su capacidad para responder a 16,16-dimetil PGE₂ y la combinación de dmPGE₂ y medrisona. En este caso, se trataron CD34⁺ de médula ósea previamente congelada en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM + medrisona 10 µM durante 4 horas a 37 °C. Entonces se lavaron y se resuspendieron las células en SFEM durante 2 horas. Entonces se evaluó la proteína de la superficie CXCR4 por citometría de flujo como se describe previamente. El tratamiento de células CD34⁺ de MO en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM sola o 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM + medrisona 10 µM da como resultado un aumento en el nivel de la expresión de proteínas CXCR4 de 12 y 20 veces de aumento, respectivamente. Además, el tratamiento en SFEM con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM + medrisona 10 µM da como resultado un aumento de 12 veces en el porcentaje de células CXCR4⁺ (Figuras 4A y 4B).
15
20

Ejemplo 3

25 Ensayos de migración en Transwell de SDF-1

Métodos

30 Se realizaron ensayos de migración en Transwell usando cámaras de quimiotaxia de 96 pocillos, membrana de policarbonato de tamaño de poro 5 µM (Corning Inc., Corning, NY) según instrucciones del fabricante. Brevemente, se trataron entonces células CD34⁺ durante 4 horas a 37 °C con 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂), dmPGE₂ y glucocorticoide, o control de DMSO a una concentración de 10 µM en medio StemSpan® (Stem Cell Technology, Vancouver, Canadá). Entonces se lavaron las células por centrifugación (300 x g durante 10 minutos) y se resuspendieron en tampón de ensayo de Transwell (medio RPMI libre de rojo fenol (Mediatech), 0,5 % de BSA libre de lípido (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40.000-60.000 células/75 µl.
35

Para probar la duración de los efectos del tratamiento, se lavó una porción de las células tratadas por centrifugación (300 x g durante 10 minutos) y se resuspendió en medio StemSpan® durante 4 horas a 37 °C sin dmPGE₂, glucocorticoides, o DMSO, y luego se lavó otra vez por centrifugación (300 x g durante 10 minutos) y se resuspendió en tampón de ensayo de Transwell (medio RPMI libre de rojo fenol (Mediatech), 0,5 % de BSA libre de lípido (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40.000-60.000 células/75 µl.
40

Se añadieron setenta y cinco µl de suspensión de células a la cámara superior de la placa, mientras que se añadieron 235 µl de medio de ensayo de Transwell que contenía 0 o 50 ng/ml de SDF1α (R&D System, Minneapolis, MN) al pocillo inferior. Se obtuvo el número total de células en el pocillo inferior por citometría de flujo después de 2,5 horas de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂.
45

Resultados

50 Se trataron células CD34⁺ con control de DMSO, dmPGE₂, o dmPGE₂ y medrisona como se ha descrito anteriormente. Se dispusieron las células tratadas en las cámaras superiores de un placa de cultivo Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadido a la cámara superior. El tratamiento con dmPGE₂ aumentó la migración accionada por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 7). El tratamiento de combinación de dmPGE₂ y medrisona aumentó la migración celular accionada por SDF1 más que dmPGE₂ sola o el control de DMSO (véase la Figura 7). Así, las células CD34⁺ en SFEM tratadas con dmPGE₂, o dmPGE₂ y medrisona, migraron más eficientemente hacia SDF1 en comparación con las células tratadas con control de DMSO.
55

Se trataron células CD34⁺ con control de DMSO, dmPGE₂, o dmPGE₂ y un glucoesteroide (medrisona, hidrocortisona, triamcinolona, alclometasona, dipropionato de alclometasona o dexametasona) como se ha descrito anteriormente. Se dispusieron las células tratadas en las cámaras superiores de una placa de cultivo de Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadido a la cámara superior. El tratamiento con dmPGE₂ aumentó la migración celular accionada por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 8). Además, el tratamiento con dmPGE₂ combinado con o medrisona, hidrocortisona, triamcinolona, alclometasona, dipropionato de alclometasona o dexametasona aumentó la migración celular accionada por SDF1 más eficazmente que dmPGE₂ sola o el control de DMSO (véase la Figura 8). Así, células CD34⁺ tratadas en SFEM con dmPGE₂, o dmPGE₂ y diversos glucocorticoides, migraron más eficientemente hacia SDF1 en comparación con las células tratadas con el control de DMSO y mostraron que la propiedad de migración mejorada de las células tratadas con el agonista de la vía de la prostaglandina/glucoesteroide no se limita a un glucocorticoide particular.

Se probó la duración del efecto de migración mejorado de células tratadas con dmPGE₂/glucocorticoide hacia SDF-1. Se trataron células CD34⁺ con DMSO o dmPGE₂ y medrisona. Se dispusieron células recién tratadas o células tratadas incubadas durante 4 adicionales sin tratamiento adicional (como se ha descrito anteriormente) en las cámaras superiores de una placa de cultivo Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF-1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadido a la cámara superior. El tratamiento con dmPGE₂ y medrisona aumentó la migración celular accionada por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 9). Además, migraron las células tratadas con dmPGE₂ y medrisona incubadas durante 4 horas adicionales sin tratamiento adicional, así como las células recién tratadas. Así, el efecto de migración mejorada de las células tratadas con el agonista de la vía de la prostaglandina/glucoesteroide hacia SDF-1 es estable durante al menos cuatro horas, que indica que el efecto también estaría presente en la administración de las células tratadas a un sujeto.

Ejemplo 4

Las células CD34⁺ tratadas con PGE₂ y PGE₂/glucocorticoide mejoran la función neurológica y locomotora en un modelo de isquemia de rata

Métodos

Se sometieron ratas macho adultas Wistar a una isquemia focal transitoria bloqueando la arteria cerebral media derecha, modelo MCAO (oclusión de la arteria cerebral media). Se introdujo una sutura quirúrgica de nailon con una punta redondeada desde la arteria carótida externa en la luz de la arteria carótida interna hasta que bloqueó el origen de la arteria cerebral media. Después de 2 horas, se sacó la sutura para permitir la reperfusión. Un día después de la reperfusión, se inyectó a las ratas por la vena de cola con o disolución salina equilibrada con Hanks (HBSS), células CD34⁺ tratadas con DMSO o células CD34⁺ tratadas con dmPGE₂ y medrisona. También se incluyó un inhibidor de tipo 4 de la fosfodiesterasa (YM976) para aumentar la durabilidad del efecto celular mejorado. El trabajo de los presentes inventores demuestra que los inhibidores de PDE4 no cambian significativamente las propiedades de la célula mejorada. Se incubaron las células con el compuesto o DMSO en medio de cultivo durante 4 horas a 37 °C. Antes de la inyección, se centrifugaron las células pretratadas; se aspiró el sobrenadante resultante; y se resuspendió el sedimento de células en HBSS.

Un día y 1, 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inyección, se evaluaron las ratas para los déficits neurológicos con prueba conductual realizada por un investigador que se cegó a los grupos experimentales. Se calculó una puntuación de intensidad neurológica modificada (PGNm) basándose en un panel publicado de pruebas motoras, sensoriales, de equilibrio y de reflejos (Chen et al., Stroke 32:2682-2688 (2001)).

Además, 1 día y 1, 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inyección, se evaluó la función locomotora en las ratas tratadas con una prueba de faltas de pie en la que el animal cruzó una pasarela perforada. Se midieron el número total de pasos de las extremidades anteriores y el número de pasos erróneos, en los que la extremidad anterior izquierda cayó a través de una perforación.

Resultados

Se administró ratas con HSPC tratadas, y se probó la capacidad del efecto del tratamiento para reducir el déficit neurológico en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO. Se inyectó por vía intravenosa HSPC tratadas 24 horas después de la lesión cerebral isquémica unilateral. Se evaluó la función neurológica con una batería de pruebas conductuales y se informaron como PGNm. Las células tratadas con dmPGE₂ y medrisona mejoraron significativamente las PGNm a los 7, 14 y 35 días en comparación con el control de vehículo, mientras que las células tratadas con DMSO no afectaron significativamente PGNm (véase la Figura 10). *p < 0,05 (n=6/grupo).

Se administró ratas con HSPC tratadas con dmPGE₂ y medrisona, y se probó la capacidad del efecto del tratamiento

para reducir el déficit locomotor en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO. Se inyectó por vía intravenosa HSPC tratadas 24 horas después de la lesión cerebral isquémica unilateral. Se evaluó la función locomotora como el % de faltas de pie cuando se cruza una pasarela perforada. Las células tratadas con dmPGE₂ y medrisona disminuyeron significativamente el % de faltas de pie a los 7 y 35 días en comparación con el control de vehículo, mientras que las células tratadas con DMSO no afectaron significativamente el % de faltas de pie (véase la Figura 11). *p < 0,05 (n=6/grupo).

Así, las HSPC tratadas con un agonista de la vía de la prostaglandina y un glucocorticoide trataron eficazmente la isquemia y los síntomas asociados a ella, en el modelo de MCAO de rata.

Ejemplo 5

Métodos

Aislamiento de células Lin(-)CD34⁺ de sangre del cordón completa tratada

Se obtuvieron células mononucleares de sangre del cordón completa humana de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá). Después de la descongelación, las células se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ o controles apropiados, por ejemplo, DMSO, en medio LMD/5 % de HSA.

Después del tratamiento, las células se lavaron con medio LMD/5 % de HSA, se centrifugaron durante 10 minutos a 650 x g a temperatura ambiente y se resuspendieron en un tampón de selección frío (solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca⁺ o Mg⁺; EDTA 2 mM; y 0,5 % de HSA). Se realizó selección magnética usando el kit Lineage (Lin) Depletion (Miltenyi Biotec, CA) seguido por un kit de enriquecimiento de CD34⁺ (Miltenyi Biotec). El agotamiento del linaje y el enriquecimiento de células CD34⁺ se realizaron según instrucciones del fabricante usando un separador QuadroMACS™. Durante este proceso, las células se mantuvieron a 4 °C. Una vez se aislaron las células Lin-CD34⁺ de la sangre del cordón completa tratadas, se analizó una alícuota por citometría de flujo para evaluar la pureza. La pureza de las células fue superior al 90 %. La mayoría de las células se usaron para la extracción de ARN usando el kit de aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para el análisis Affymetrix.

Se aislaron las células CD34⁺ descritas en los ejemplos anteriores de sangre del cordón, sangre periférica movilizada y células de la médula ósea, como se indica, y se obtuvieron de Stem Cell Technologies y All Cells LLC. Tras recibir estas células, se determinó el nivel de contaminación de células diferenciadas por citometría de flujo, basándose en la cantidad de marcadores de linaje presentes sobre la superficie de las células CD34⁺. Las células CD34⁺ que expresan marcadores de linaje son células progenitoras diferenciadas que no tienen la misma capacidad de autorrenovación que las células CD34⁺ de linaje negativo. Todas las células CD34⁺ obtenidas de estas empresas y referenciadas en los experimentos en el presente documento fueron al menos 85 % de células CD34⁺/Lin(-).

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una célula madre o progenitora hematopoyética humana, comprendiendo el método poner en contacto la célula madre o progenitora hematopoyética *ex vivo* con uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina y uno o más glucocorticoides; en donde la expresión génica de CXCR4 aumenta en al menos aproximadamente 30 veces en la célula madre o progenitora hematopoyética contactada en comparación con las células madre o progenitoras hematopoyéticas no contactadas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina se seleccionan de:
- (i) un compuesto que se une selectivamente a PGE₂ EP₂ o el receptor de PGE₂ EP₄;
 - (ii) PGE₂, 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂), 15(S)-15-metil PGE₂, 20-etil PGE₂, o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE₂;
 - (iii) PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂; o
 - (iv) 16,16-dimetil PGE₂.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el uno o más glucocorticoides se seleccionan del grupo que consiste en medrisona, aclometasona, dipropionato de aclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clorcortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, difluocortolona, valerato de difluocortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, hemihidrato de flunisolida, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednido, acetato de fluprednido, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, meprednisona, 6 α -metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetazol.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la célula madre o progenitora hematopoyética o célula se ha puesto en contacto con uno o más agonistas del receptor de la prostaglandina o uno o más glucocorticoides durante un tiempo de
- (i) al menos aproximadamente una hora;
 - (ii) aproximadamente una hora a aproximadamente veinticuatro horas;
 - (iii) aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas; o
 - (iv) aproximadamente dos horas a aproximadamente cuatro horas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la célula madre o progenitora hematopoyética se obtiene de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, gelatina de Wharton, placenta, o sangre fetal.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la célula
- (i) no se expande *ex vivo*;
 - (ii) se generó en un análisis de diagnóstico inmediato y la célula o células no se cultivan; o
 - (iii) en donde la composición se lava y está sustancialmente libre del uno o más agonistas de la vía de la prostaglandina y el uno o más glucocorticoides.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista del receptor de la prostaglandina es 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂).
8. El método de la reivindicación 1, en donde el glucocorticoide es dexametasona.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista del receptor de la prostaglandina es 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂) y el glucocorticoide es dexametasona.

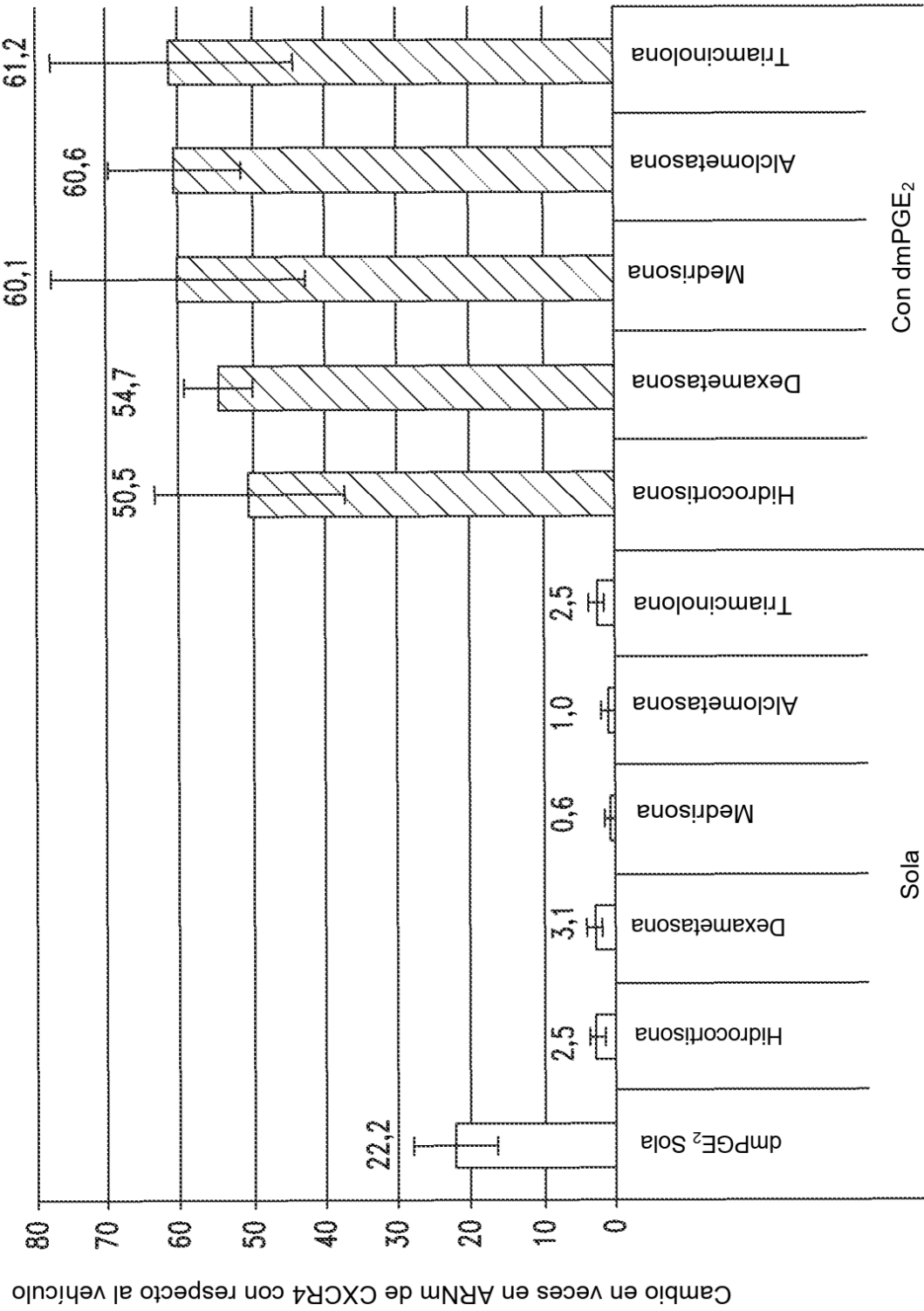


FIG. 1

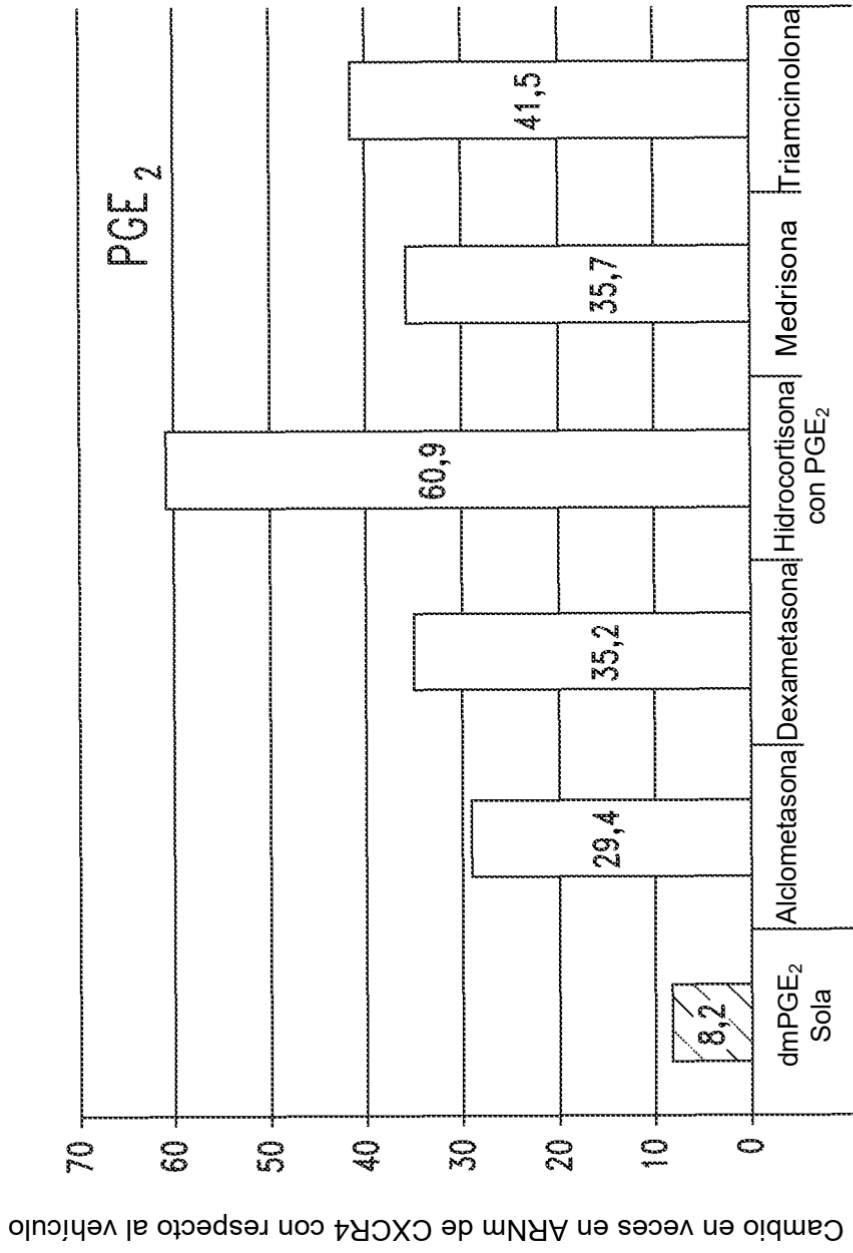


FIG. 2A

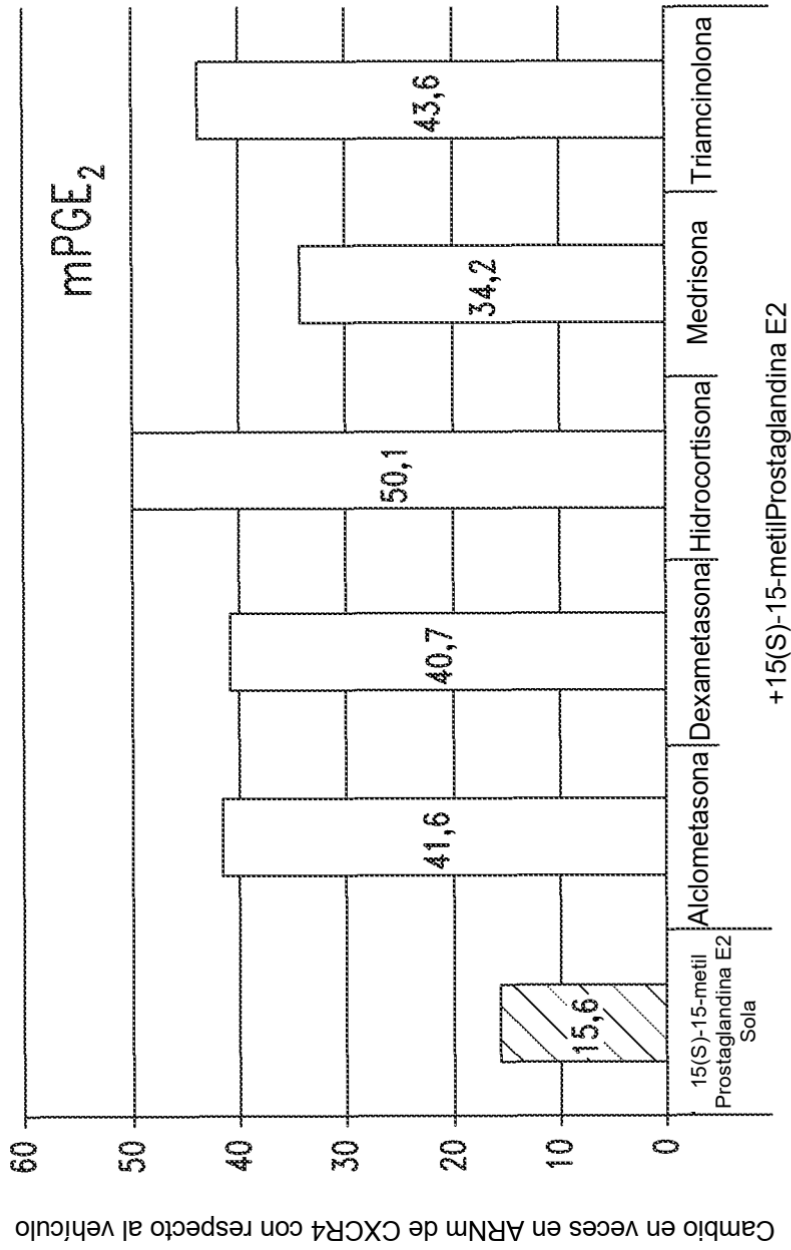


FIG. 2B

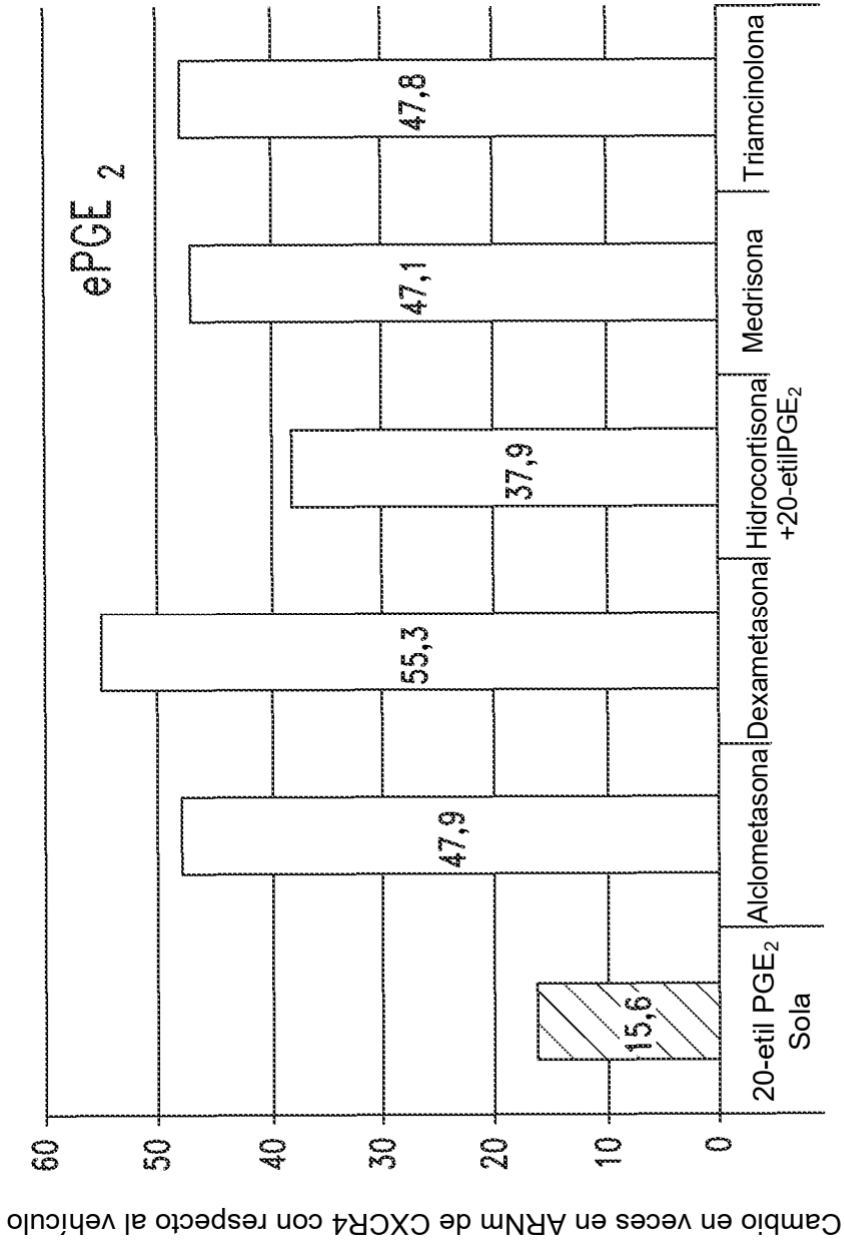


FIG. 2C

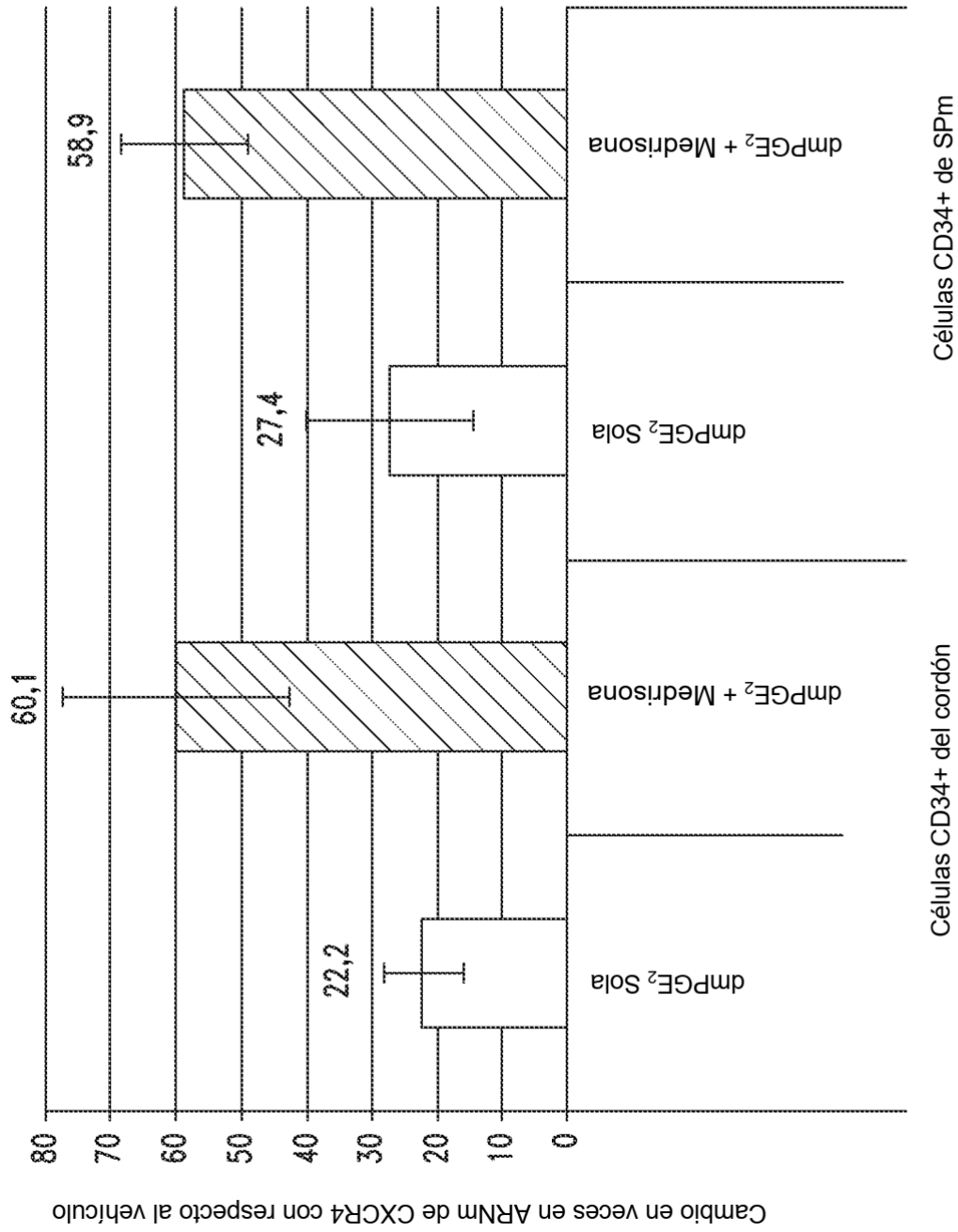


FIG. 3

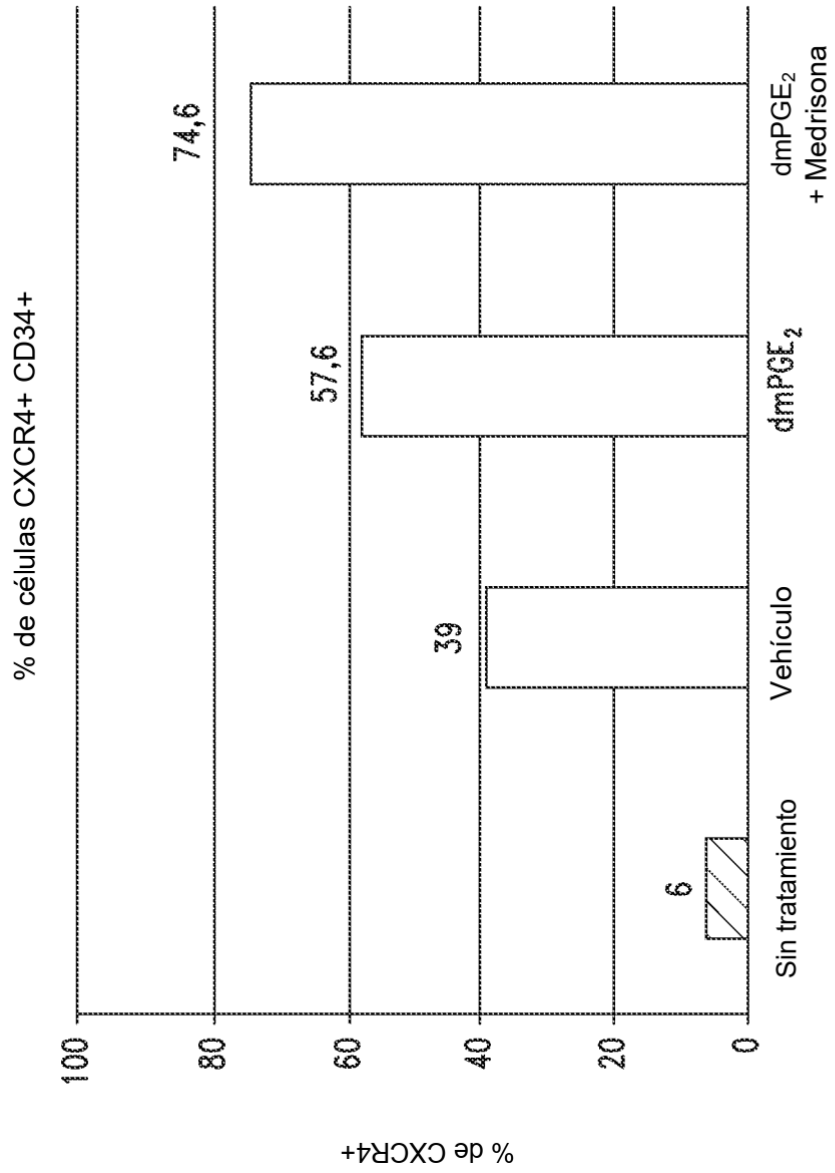


FIG. 4A

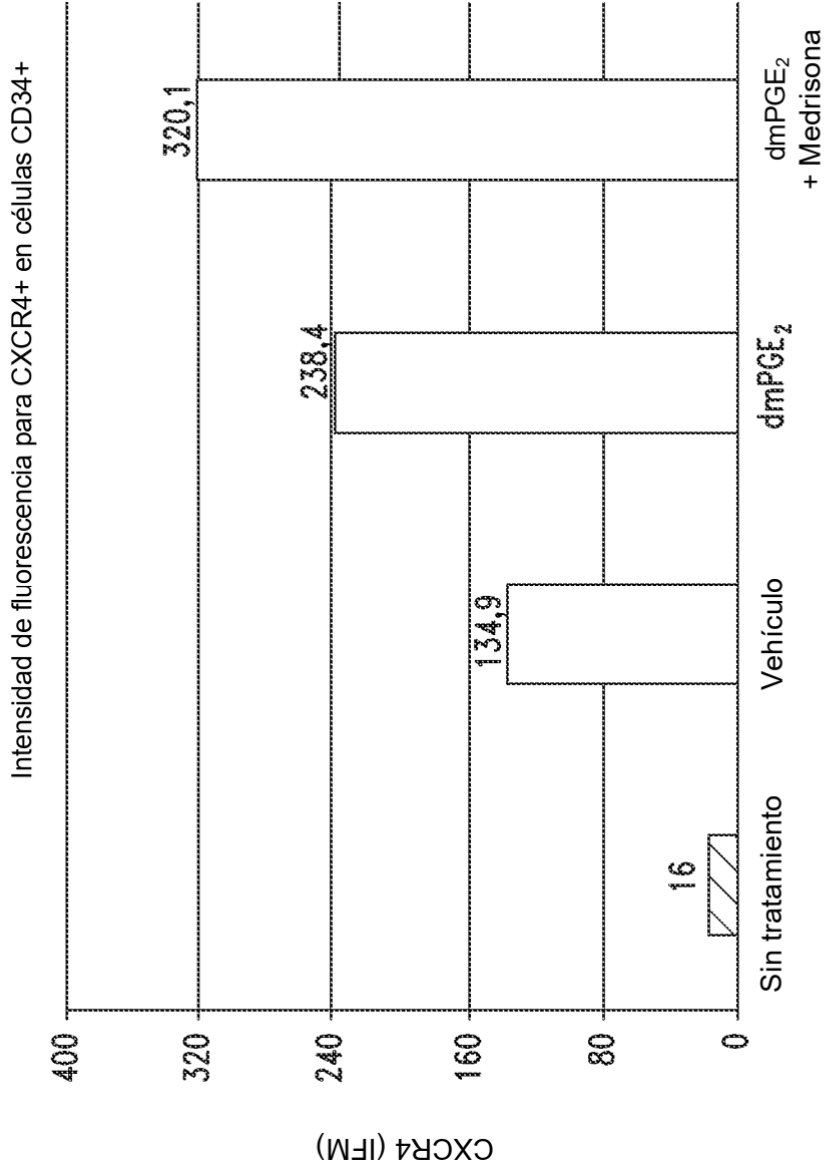


FIG. 4B

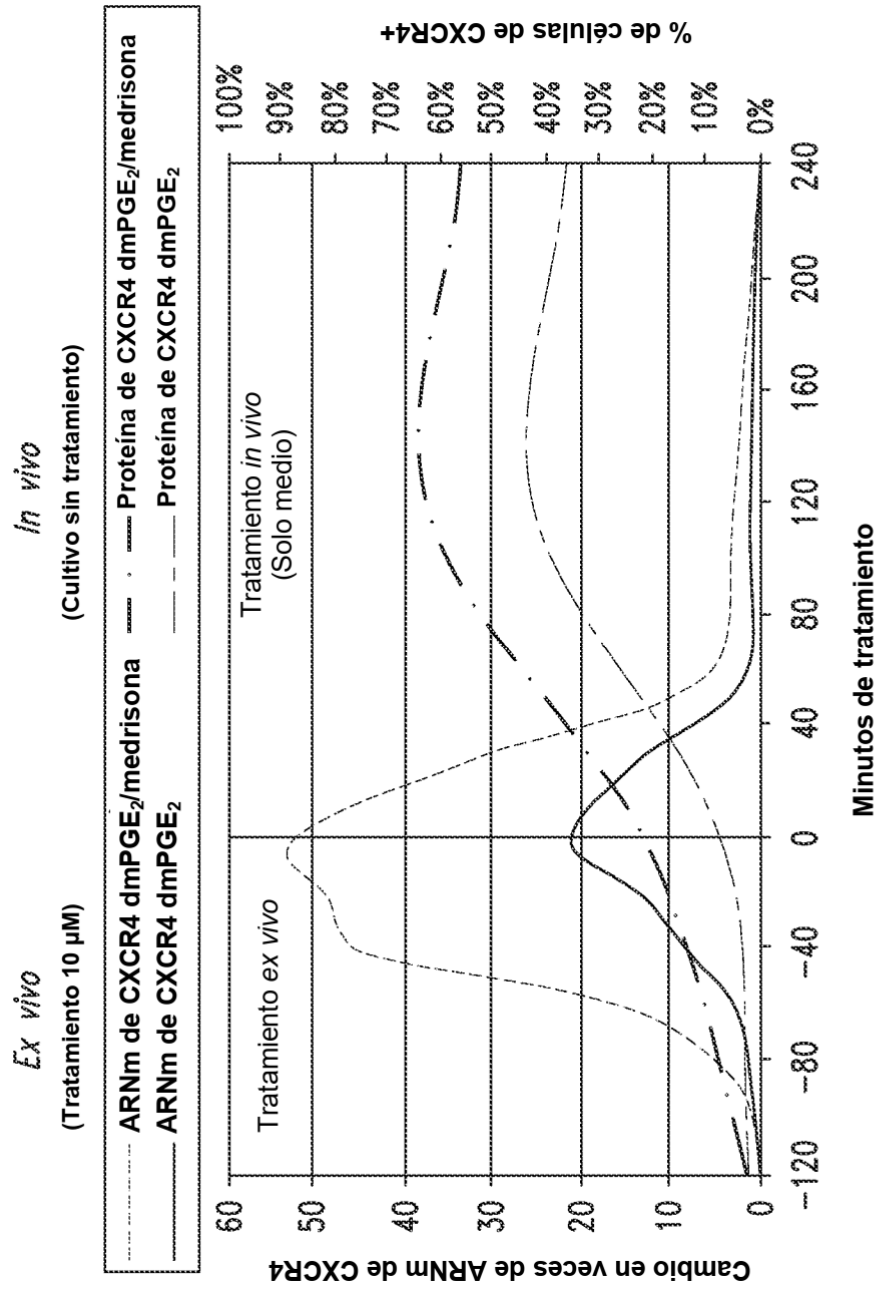


FIG. 5

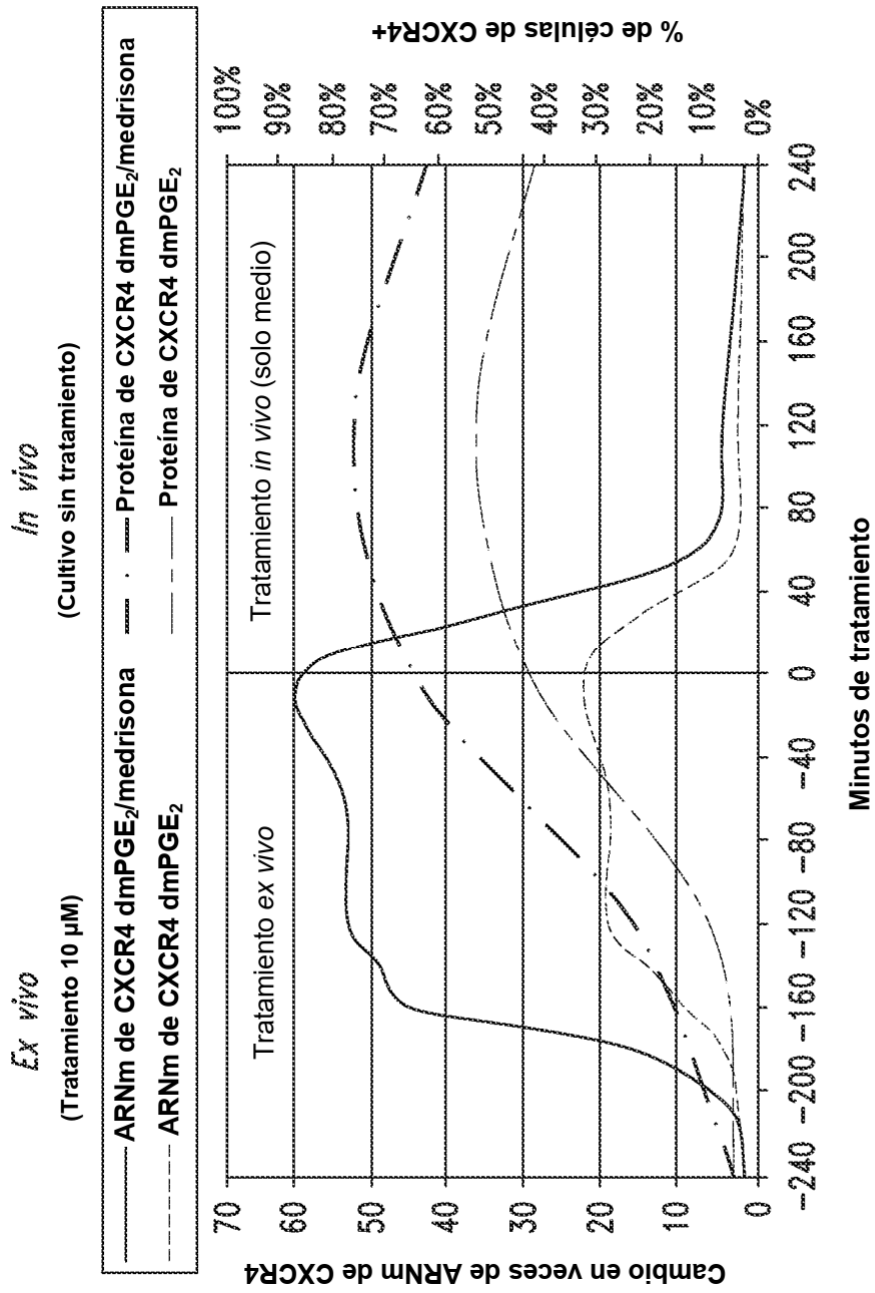


FIG. 6

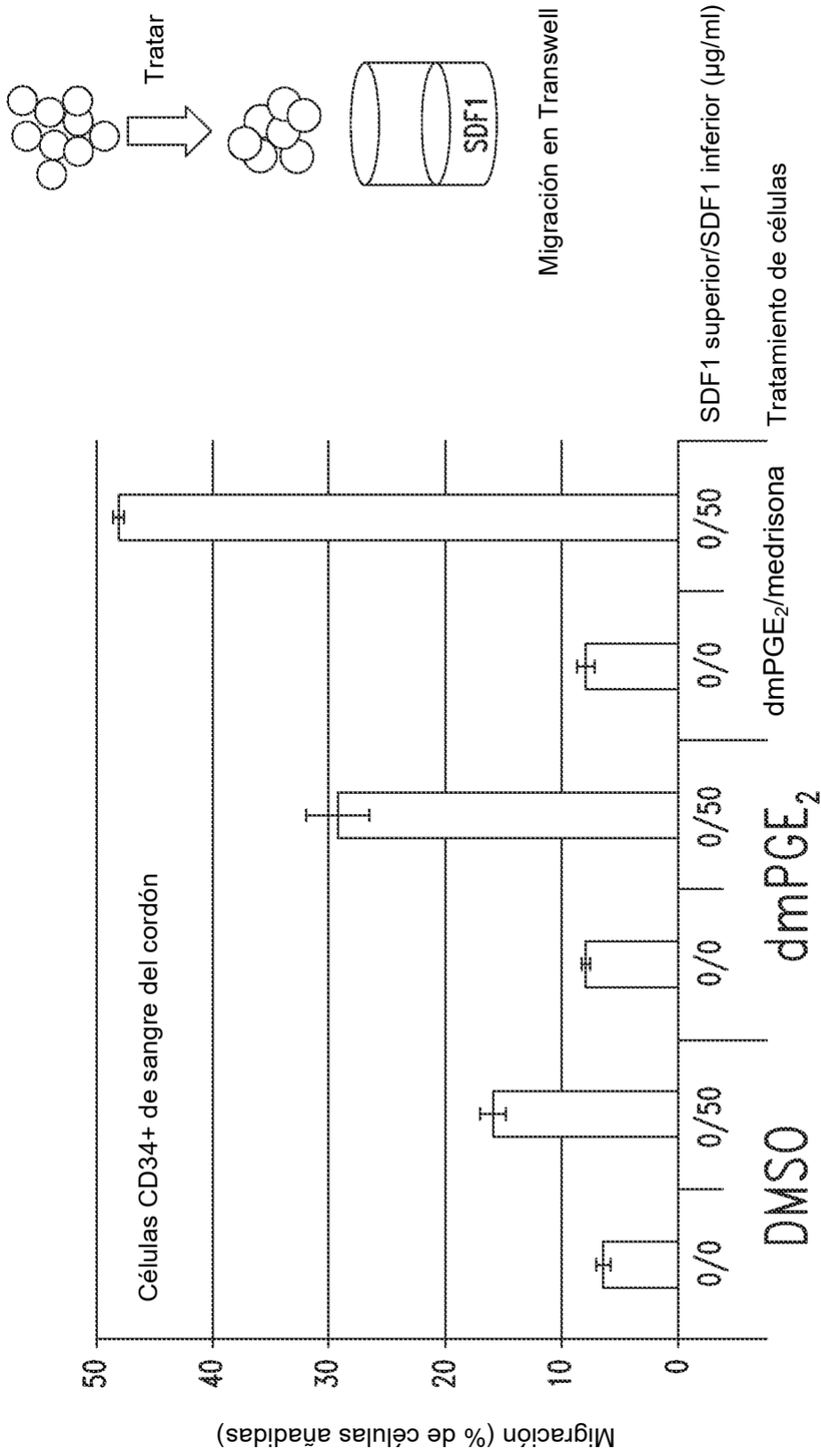


FIG. 7

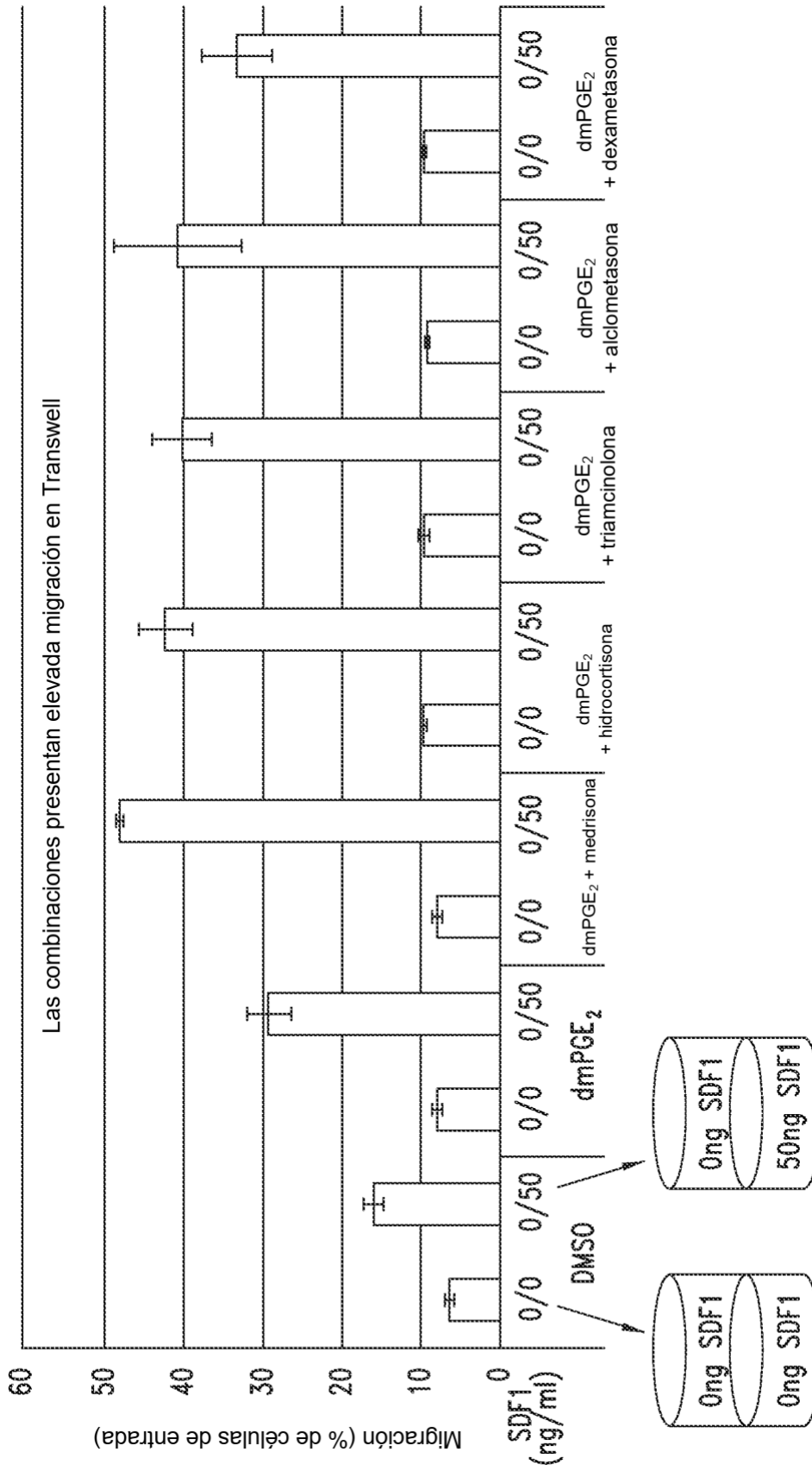
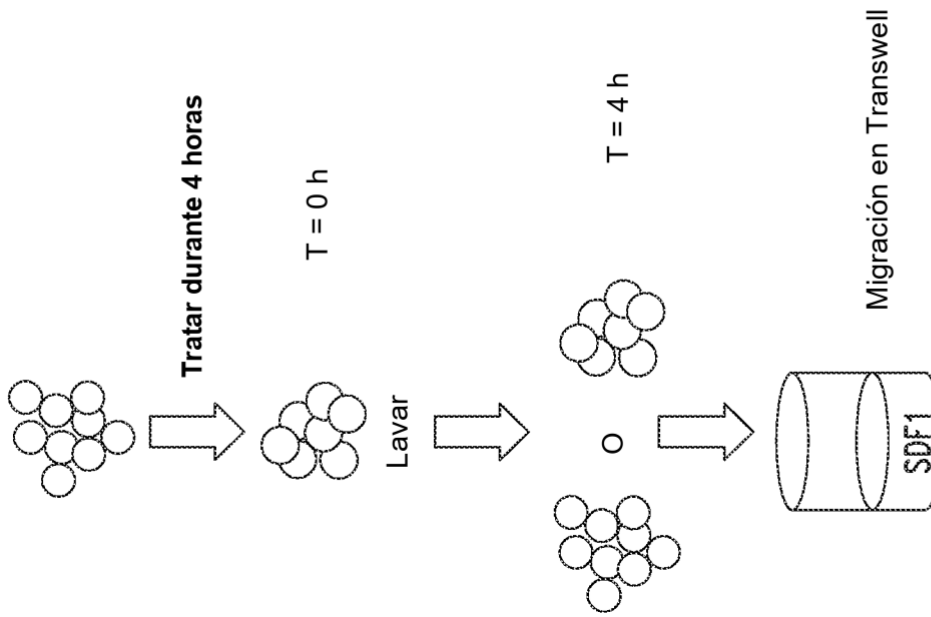
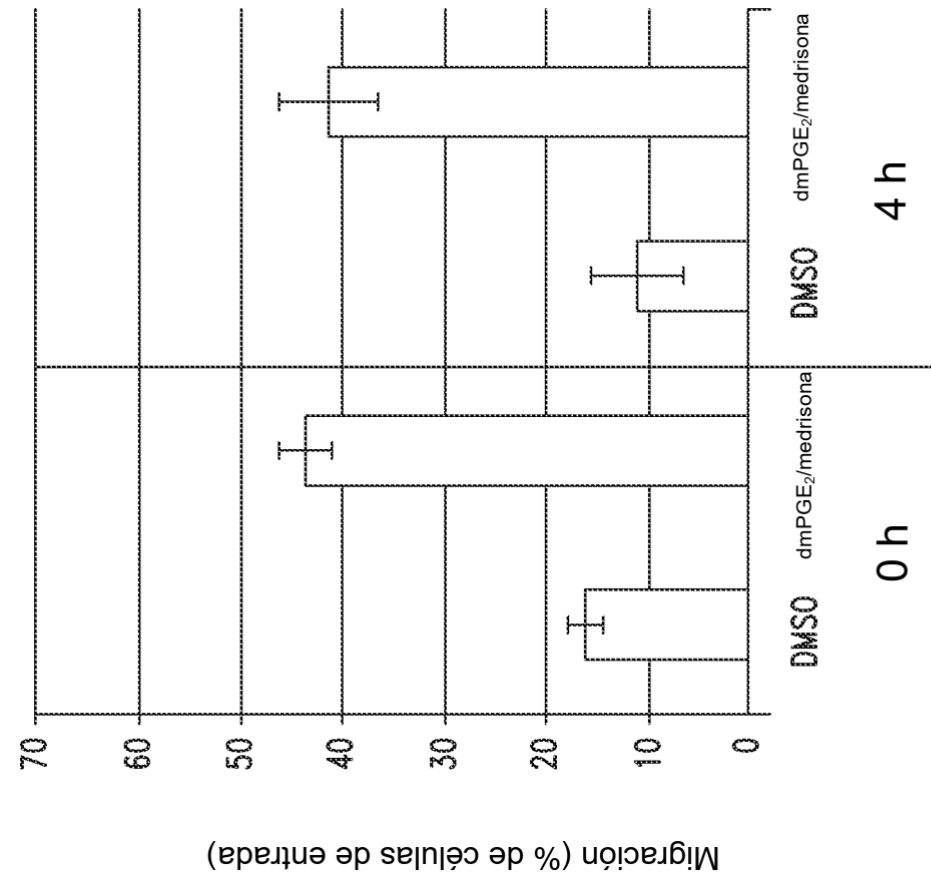


FIG. 8



Tiempo *in vivo*

FIG. 9

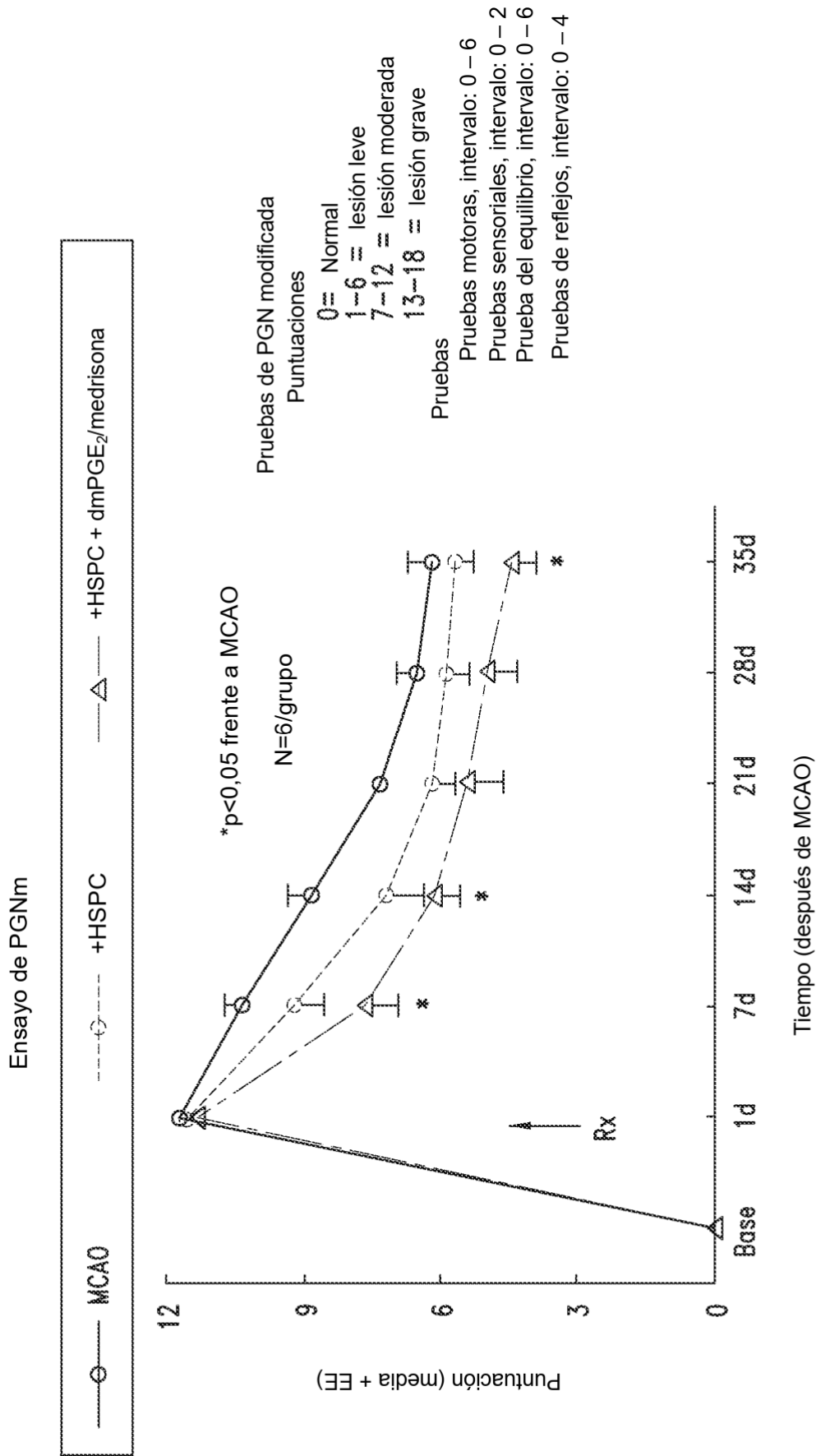


FIG. 10

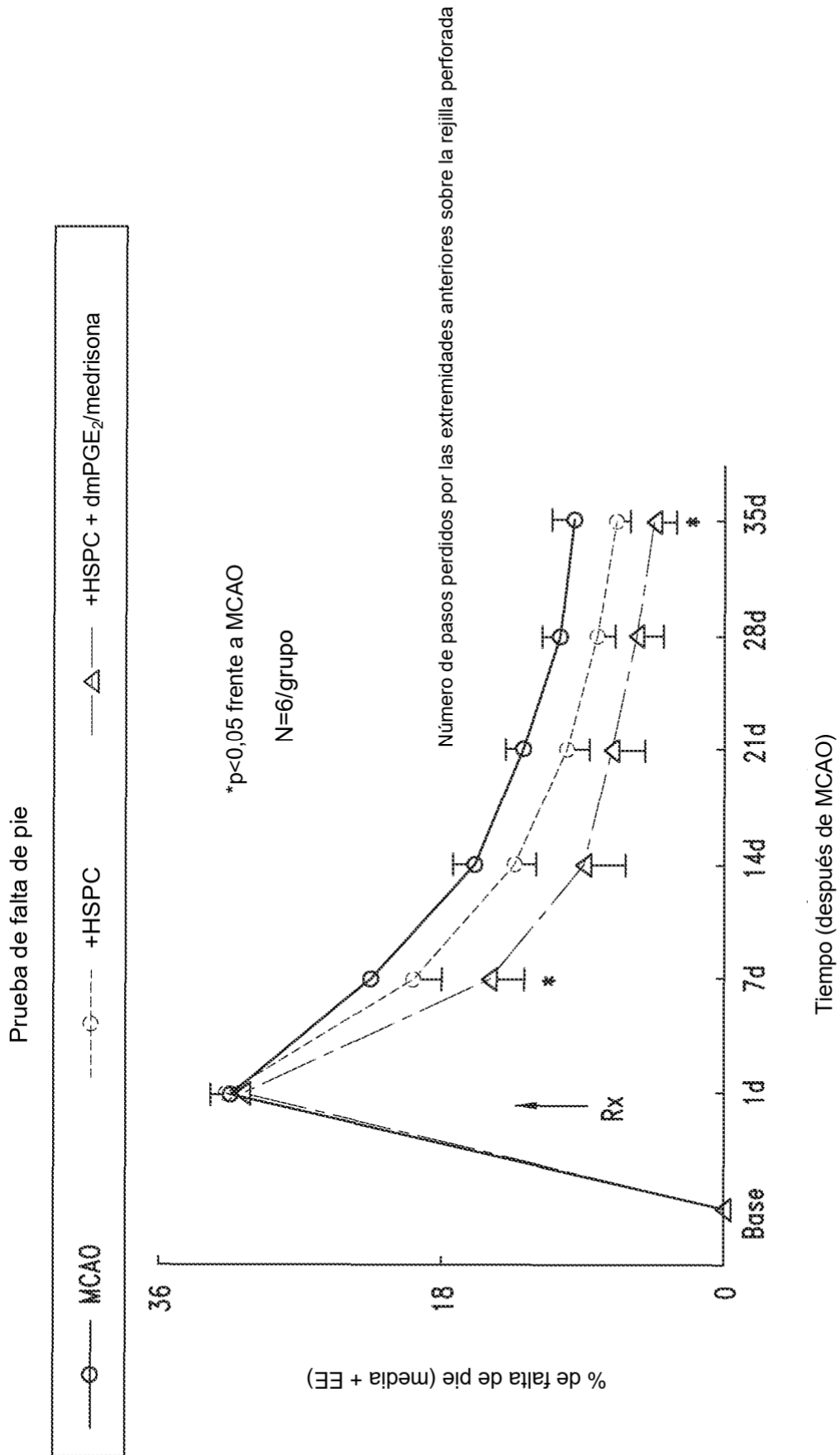


FIG. 11