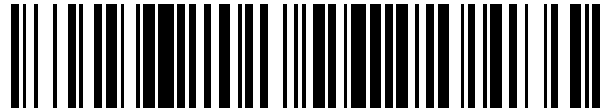


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 165**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2009 E 09786159 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2328594**

54 Título: **Células madre del estroma derivadas de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de SRIS**

30 Prioridad:

**04.08.2008 GB 0814249**

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

**24.06.2016**

73 Titular/es:

**TIGENIX, S.A.U. (33.3%)  
Parque Tecnológico de Madrid C/ Marconi, 1  
28760 Tres Cantos - Madrid, ES;  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (33.3%) y  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DELGADO, MARIO;  
GONZÁLEZ-REY, ELENA y  
BÜSCHER, DIRK**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 575 165 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).

**Células madre del estroma derivadas de tejido adiposo para su uso en el tratamiento de SRIS****Descripción****5 ANTECEDENTES A LA INVENCIÓN**

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) es un estado inflamatorio del cuerpo entero sin una fuente específica de infección. Puede producirse por muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, traumatismo, cirugía, insuficiencia suprarrenal, embolia pulmonar, infarto de miocardio, hemorragia, anafilaxia, sobredosis de fármacos, inmunodeficiencia y quemaduras. Hay cuatro síntomas de diagnóstico importantes del SRIS, como se enumera a continuación, pero la presencia de dos cualesquiera de estos es suficiente para un diagnóstico (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl. A, 1-7).

- 15 i) una frecuencia cardíaca superior a 90 latidos por minuto;
- ii) una temperatura corporal inferior a 36 °C o superior a 38 °C;
- iii) una frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones por minutos (taquipnea); y
- 20 vi) un número de leucocitos inferior a 4000 células/mm<sup>3</sup> o superior 12000 células/mm<sup>3</sup>, o la presencia de más del 10 % de neutrófilos inmaduros.

El SRIS produce una amplia activación de proteínas inmunogénicas de fase aguda, que afecta el sistema del complemento y las vías de coagulación, que a su vez produce daño a la vasculatura, además de a los órganos internos. Posteriormente se activan diversos sistemas contra-reguladores neuroendocrinos, que frecuentemente agravan el problema.

La septicemia es una forma específica del SRIS, y la causa de muerte más común en las unidades de cuidados intensivos. Se produce por una sospecha de infección o infección detectada. Se caracteriza por una red hiperactiva y fuera de equilibrio de citocinas pro-inflamatorias endógenas, y frecuentemente conduce a una inflamación generalizada y coagulación de la sangre, que puede producir rojez, calor, hinchazón, dolor, disfunción orgánica o fallo orgánico. La coagulación de la sangre durante la septicemia también puede producir una circulación sanguínea reducida a las extremidades y órganos vitales, y puede conducir a fallo orgánico o a la aparición de gangrena.

Al igual que el SRIS, la septicemia frecuentemente produce una inflamación aguda presente en todo el cuerpo y está, por tanto, frecuentemente asociada a fiebre y leucocitosis (elevado número de leucocitos). La moderna teoría detrás de la septicemia es que la respuesta inmunitaria del huésped a la infección desencadena el SRIS, que a su vez presenta los síntomas descritos anteriormente. Tras la infección y la septicemia, la perfusión de tejido y la administración de oxígeno pueden reducirse, conduciendo a choque séptico. Con el fin de ser diagnosticado con choque séptico, debe haber evidencia de infección e hipotensión refractaria en el paciente.

El SRIS, la septicemia y el choque séptico son graves afecciones médicas. Incluso con tratamiento inmediato y agresivo es probable que estas enfermedades progresen a síndrome de disfunción multiorgánica y pueden incluso producir la muerte.

La mayoría de las estrategias terapéuticas hasta la fecha se han dirigido a mediadores pro-inflamatorios, pero no se ha encontrado que mejoren la supervivencia de pacientes cuando se estudian en grandes ensayos clínicos multicéntricos. Las terapias diseñadas para bloquear una única citocina, tal como TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , han mostrado eficacia limitada probablemente debido a la cinética temprana y transitoria de estas citocinas inflamatorias. Recientemente, los expertos internacionales en el cuidado crítico y en enfermedades infecciosas han desarrollado pautas de tratamiento para mejorar el tratamiento dado a los pacientes que padecen SRIS, septicemia o choque séptico (Dellinger, 2004). Estas pautas tienen como objetivo transformar las complejas decisiones diagnósticas y terapéuticas en simples tareas "críticas a la misión" y, entre otros tratamientos, sugieren la administración de antibióticos de amplio espectro, esteroides y drotrecogina alfa (activada).

El documento WO2005/093044 describe métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, respuestas alérgicas, cáncer o enfermedades inflamatorias en un animal, que promueven la cicatrización, y que promueven la angiogénesis en un órgano o tejido de un animal administrando al animal células madre mesenquimatosas en una cantidad eficaz.

Sin embargo, la mortalidad asociada a la septicemia sigue siendo de un 30 % al 50 %, mientras que se informa que la tasa de mortalidad para choque séptico es incluso mayor, un 50 % al 60 %. Se informa que hay aproximadamente 750.000 nuevos casos de septicemia cada año, produciendo al menos 210.000 de éstos una muerte. A medida que los tratamientos médicos se vuelven más agresivos, es probable que aumenten las incidencias de SRIS, septicemia y choque séptico, y por consiguiente se requiere un nuevo tratamiento fiable para estas afecciones.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado que la administración de células madre mesenquimatosas (CMM), en particular células madre del estroma derivadas de tejido adiposo humano (CEAh), protege contra la mortalidad en dos modelos *in vivo* de endotoxemia y septicemia grave, proporcionando evidencia de que las CMM pueden ser útiles en el tratamiento de SRIS, septicemia y choque séptico. Se ha encontrado que las CMM funcionan a varios niveles para regular aspectos cruciales del SRIS, que incluyen por reducción de niveles sistémicos de diversas citocinas y quimiocinas inflamatorias, y por inhibición de la infiltración de leucocitos en diversos órganos diana. La invención, por tanto, proporciona una composición que comprende células madre del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA) para su uso en el tratamiento de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) en un sujeto. Estos y otros aspectos de la divulgación se describen más abajo en más detalle.

## BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la caracterización de células como se define por los marcadores expresados por la célula, y se mide por tinción de inmunofluorescencia. La frecuencia de células inmunopositivas se indica del siguiente modo: -, inferior al 5 %; +/-, 6-15 %; +, 16-50 %; ++, 51-85 %; y +++, 86-100 %. P, Número de pases.

La Figura 2 muestra la caracterización indirecta por inmunofluorescencia de células madre del estroma derivadas de tejido adiposo. El color azul indica núcleos teñidos con DAPI. (A) CD90; (B) c-Kit; y (C) vimentina.

La Figura 3 muestra el análisis de inmunocitometría de fluorescencia del perfil de marcadores de superficie (CD3, CD9, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD29, CD31, CD34, CD36, CD38, CD44, CD45, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD90, CD95, CD102, CD104, CD105, CD106, CD133, CD166, glicoforina,  $\beta$ 2-microglobulina, HLA I, HLA II y NGFR) obtenidos de células aisladas de muestras de liposucción.

La Figura 4 muestra el efecto de la incubación con reactivos pro-inflamatorios sobre la expresión deIDO en células madre mesenquimatosas aisladas de tejido adiposo humano. A) Detección por RT-PCR. B) Detección por transferencia Western. IL-1, interleucina 1; TNF- $\alpha$ , factor-alfa de necrosis tumoral; LPS, lipopolisacárido; IFN- $\gamma$ , interferón-gamma; C-, control negativo; C+, control positivo; n.i., células no inducidas con IFN- $\gamma$ . Se usa GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga de RT-PCR.

La Figura 5 muestra análisis de inmunocitometría de fluorescencia del perfil de marcadores superficiales expresados por CEA. Se muestran controles de isotipo (controles negativos) sombreados en gris.

La Figura 6 muestra el efecto de la estimulación de CEAh sobre la secreción de IFN $\gamma$  y la proliferación de CMSP.

La Figura 7 muestra la respuesta de CEAh a LPS o CLP: (A) La supervivencia celular se monitorizó cada 12 h; (B) Niveles de citocinas y quimiocinas en el hígado, intestino y pulmón; (C) Concentración de células inflamatorias que infiltran la cavidad peritoneal; (D) Infiltración de neutrófilos en órganos diana, determinada midiendo la actividad de MPO en extractos de proteína. n=10 ratones/grupo. \*p<0,001 frente a controles con LPS solo o CLP solo.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos y expresiones deben tener los significados expuestos a continuación. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido para un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

Los artículos "un" y "una" se refieren 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 término "aproximadamente", cuando se usa en relación con un valor, se refiere al valor  $\pm$  10 %.

Por "tejido adiposo" se indica cualquier tejido adiposo. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón o blanco, derivado de, por ejemplo, sitio de tejido adiposo subcutáneo, omental/visceral, mamario, gonadal, u otro sitio de tejido adiposo. Preferentemente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. El tejido adiposo puede comprender un cultivo celular primario o una línea celular inmortalizada. El tejido adiposo puede ser de cualquier organismo que tenga tejido adiposo. En algunas realizaciones, el tejido adiposo es de mamífero, y en realizaciones adicionales el tejido adiposo es humano. Una fuente conveniente de tejido adiposo es la cirugía de liposucción. Sin embargo, se entenderá que ni la fuente de tejido adiposo ni el método de aislamiento de tejido adiposo es crítico para la invención. Si se desean células como se describen en el presente documento para trasplante autólogo en un sujeto, el tejido adiposo se aislará de ese sujeto.

"Células madre del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA)" se refiere a CMM que se originan a partir de tejido adiposo, generalmente de tejido adiposo humano (CEAh).

El término "constitutivamente" se entiende que significa la expresión de un gen sin ninguna inducción específica.

El término “cultivo” se refiere al crecimiento de células, organismos, entidades multicelulares o tejido en un medio. El término “cultivar” se refiere a cualquier método de conseguir tal crecimiento, y puede comprender múltiples etapas. El término “cultivar adicionalmente” se refiere a cultivar una célula, organismo, entidad multicelular o tejido hasta una cierta etapa de crecimiento, luego usar otro método de cultivo para llevar dicha célula, organismo, entidad multicelular o tejido a otra etapa de crecimiento. Un “cultivo celular” se refiere a un crecimiento de células *in vitro*. En un cultivo tal, las células proliferan, pero no se organizan ellas mismas en tejido. Un “cultivo de tejido” se refiere al mantenimiento o crecimiento de tejido, por ejemplo, explantes de órgano primordial o de un órgano adulto *in vitro* para preservar su arquitectura y función. Un “cultivo en monocapa” se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican en un medio adecuado mientras que se unen principalmente entre sí y a un sustrato. Además, un “cultivo en suspensión” se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican mientras que están suspensas en un medio adecuado. Asimismo, un “cultivo de flujo continuo” se refiere al cultivo de células o explantes en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento celular, por ejemplo, la viabilidad. El término “medios acondicionados” se refiere al sobrenadante, por ejemplo, libre de las células cultivadas/tejido, resultante después de un periodo de tiempo en contacto con las células cultivadas de forma que los medios han sido alterados para incluir ciertos factores paracrinicos y/o autocrinos producidos por las células y secretadas en el cultivo. Un “cultivo confluyente” es un cultivo celular en el que todas las células están en contacto y así se cubre la superficie entera del recipiente de cultivo, e implica que las células también han alcanzado su máxima densidad, aunque la confluencia no significa necesariamente que la división cesará o que la población no aumentará en tamaño.

El término “medio de cultivo” o “medio” es reconocido en la materia, y generalmente se refiere a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivas. El término “medio”, como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodean las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos, además de medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que se exponen las células que crecen sobre una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término “medio” también se refiere a material que está previsto para su uso en un cultivo celular, aunque todavía no se haya puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Similarmente, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido llega a ser adecuada para cultivo celular puede llamarse un “medio en polvo”. “Medio definido” se refiere a medios que están hechos de componentes químicamente definidos (normalmente purificados). Los “medios definidos” no contienen extractos biológicos poco caracterizados tales como extracto de levadura y caldo de res. “Medio rico” incluye medios que se diseñan para soportar el crecimiento de la mayoría de las formas o todas las formas viables de una especie particular. Los medios ricos frecuentemente incluyen extractos biológicos complejos. Un “medio adecuado para el crecimiento de un cultivo de alta densidad” es cualquier medio que permite que un cultivo celular alcance una DO600 de 3 o mayor cuando las otras condiciones (tales como la temperatura y la tasa de transferencia de oxígeno) permiten tal crecimiento. El término “medio basal” se refiere a un medio que promueve el crecimiento de muchos tipos de microorganismos que no requieren ningún suplemento de nutrientes especial. La mayoría de los medios basales generalmente comprenden cuatro grupos químicos básicos: aminoácidos, hidratos de carbono, sales inorgánicas y vitaminas. Un medio basal generalmente sirve de base para un medio más complejo, al que se añaden suplementos tales como suero, tampones, factores de crecimiento, lípidos y similares. Ejemplos de medios basales incluyen, pero no se limitan a, medio basal Eagle, medio esencial mínimo, medio Eagle modificado por Dulbecco, medio 199, mezclas de nutrientes Ham's F-10 y Ham's F-12, McCoy's 5A, Dulbecco's MEM/F-12, 1640 de RPMI y medio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM).

Los términos “comprenden” y “que comprende” se usan en el sentido abierto incluyente, que significa que pueden incluirse elementos adicionales.

El término “que incluye” se usa en el presente documento para significar “que incluye, pero no se limita a”. “Que incluye” y “que incluye, pero no se limita a” se usan indistintamente.

“Marcador” se refiere a una molécula biológica cuya presencia, concentración, actividad o estado de fosforilación puede detectarse y usarse para identificar el fenotipo de una célula.

“Células madre mesenquimatosas (CMM)” son células madre multipotentes, es decir, son células que son capaces de dar lugar a múltiples tipos diferentes de células. El término se refiere a células que son capaces de diferenciarse en al menos una de un osteoblasto, un condrocito, un adipocito o un miocito. Las CMM pueden aislarse de cualquier tipo de tejido. Generalmente, las CMM se aislarán de médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical o sangre periférica. Las CMM usadas en la invención se aíslan de tejido adiposo (CEA). En un aspecto preferido de la invención, las CMM se obtienen se lipoaspirados, obtenidos ellos mismos de tejido adiposo.

Un “paciente”, “sujeto” o “huésped” que va a tratarse por el método objeto puede significar tanto un ser humano como un animal no humano.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición prevista para su uso en terapia. Las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas, previstas para su uso en el tratamiento de SRIS,

septicemia, septicemia grave, choque séptico y afecciones tipo septicemia. Las composiciones de la invención pueden incluir, además de CMM, componentes no celulares. Ejemplos de tales componentes no celulares incluyen, pero no se limitan a, medios de cultivo celular, que pueden comprender uno o más de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, co-enzima, antioxidantes y metales.

La expresión “farmacéuticamente aceptables” se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material de encapsulamiento disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto sujeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el paciente.

El término “fenotipo” se refiere a las características observables de una célula, tales como el tamaño, morfología, expresión de proteínas, etc.

El término “célula progenitora” se refiere a una célula que tiene la capacidad de crear progenie que está más diferenciada que ella misma. Por ejemplo, el término puede referirse a una célula no diferenciada o célula diferenciada a un grado corto de diferenciación final que es capaz de proliferación y que da lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar un gran número de células madre que pueden a su vez dar lugar a células hija diferenciadas o diferenciables. En un caso, el término célula progenitora se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, frecuentemente en diferentes direcciones, por diferenciación, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que normalmente se produce a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivarse de una célula multipotente que ella misma se deriva de una célula multipotente, etc. Aunque cada una de estas células multipotentes puede considerarse células madre, la variedad de tipos de células que cada una puede dar lugar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Tal capacidad puede ser natural o puede inducirse artificialmente tras el tratamiento con diversos factores. Por esta definición, las células madre también pueden ser células progenitoras, además de los precursores más inmediatos a las células terminalmente diferenciadas.

“Proliferación” se refiere a un aumento en el número de células. “Proliferar” y “proliferación” se refieren a células que se someten a mitosis.

El término “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” (o “SRIS”) se usa en el presente documento según su significado normal, para referirse a un estado inflamatorio del cuerpo completo sin una fuente de infección. Hay cuatro síntomas de diagnóstico principales del SRIS, aunque dos cualesquiera de estos son suficientes para un diagnóstico (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl A, 1-7).

El término “septicemia” se refiere a una forma de SRIS que se produce por una sospecha de infección o infección detectada (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl. A, 1-7). Una infección que conduce a la septicemia puede producirse por, por ejemplo, un virus, un hongo, un protozoo o una bacteria.

El término “septicemia grave” se refiere a septicemia asociada a la disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl. A, 1-7).

El término “choque séptico” se refiere a la septicemia con hipotensión a pesar de la reanimación adecuada con fluidos (hipotensión refractaria), junto con la presencia de anomalías de la perfusión (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, Suppl. A, 1-7).

El término “afección tipo septicemia” se refiere a un estado en el que un paciente presenta síntomas similares a la septicemia o choque séptico, pero en el que la cascada de mediadores inflamatorios y/o el cambio en los parámetros hemodinámicos no son principalmente o inicialmente producidos por un agente infeccioso. Por ejemplo, pueden observarse afecciones tipo septicemia en un paciente con insuficiencia hepática aguda o crónica (véase Wasmuth HE, et al. *J Hepatol.* 2005 Feb;42(2): 195-201), pacientes que padecen enfermedad pos-reanimación después de paro cardíaco (véase Adrie C et al. *Curr Opin Crit Care.* 2004 Jun;10(3):208-12), pacientes que padecen síntomas tipo septicemia después de quimioterapia para el cáncer (véase Tsuji E et al. *Int J Cancer.* 2003 Nov 1;107(2):303-8), pacientes que se someten a perfusión hipertérmica del miembro aislado con TNF-alfa recombinante o tratamientos similares (véase Zwaveling JH et al. *Crit Care Med.* 1996 May;24(5):765-70) o enfermedad tipo septicemia en neonatos (véase Griffin MP et al. *Pediatr Res.* 2003 Jun;53(6):920-6).

Como se usa en el presente documento, el término “disolución” incluye un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las CMM usadas en la invención siguen viables.

El término “sustancialmente puro”, con respecto a poblaciones de CMM, se refiere a una población de células en la que al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, por número de las células son CMM. En otras palabras, el término “sustancialmente puro”, con respecto a poblaciones de CMM, se refiere a una población de células que contiene menos de aproximadamente el 20 %, menos de aproximadamente el 10 %, o menos de aproximadamente el 5 %, por número de células comprometidas con linaje.

“Soporte”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier dispositivo o material que pueda servir de base o matriz para el crecimiento de células madre del estroma derivadas de tejido adiposo.

“Agente terapéutico” o “terapéutico” se refiere a un agente capaz de tener un efecto biológico deseado sobre un huésped. Agentes quimioterapéuticos y genotóxicos son ejemplos de agentes terapéuticos que son generalmente conocidos por ser de origen químico, a diferencia de biológico, o producir un efecto terapéutico por un mecanismo de acción particular, respectivamente. Ejemplos de agentes terapéuticos de origen biológico incluyen factores de crecimiento, hormonas y citocinas. Se conoce una variedad de agentes terapéuticos en la técnica y pueden identificarse por sus efectos. Ciertos agentes terapéuticos son capaces de regular la proliferación y diferenciación celular. Ejemplos incluyen nucleótidos quimioterapéuticos, fármacos, hormonas, proteínas no específicas (no anticuerpo), oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que se unen a una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, secuencia de ARNm)), péptidos y peptidomiméticos.

Una composición de la presente divulgación puede incluir una población sustancialmente pura de CMM o la progenie de la misma. La composición también puede incluir componentes de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo que incluyen uno o más de aminoácidos, metales y factores de coenzima. La composición puede incluir pequeñas poblaciones de otras células del estroma. La composición también puede incluir otros componentes no celulares que pueden soportar el crecimiento y la supervivencia de las CMM bajo circunstancias particulares, por ejemplo, implantación, crecimiento en cultivo continuo, o uso como biomaterial o composición.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede comprender una población de células en la que al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de las células son CMM. En otras palabras, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de las células en la composición son CMM.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede comprender al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de CMM, bien calculado por número, o bien en peso o en volumen de la composición.

Las CMM pueden expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más) de los marcadores CD9, CD 10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105 a un nivel significativo.

Las CMM pueden expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más o cuatro o más) de los marcadores CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105. El término “expresado” se usa para describir la presencia de un marcador dentro de una célula. Con el fin de ser considerado como que está expresado, un marcador debe estar presente a un nivel detectable. Por “nivel detectable” se indica que el marcador puede detectarse usando una de las metodologías de laboratorio convencionales tales como PCR, transferencia o análisis de FACS. La caracterización fenotípica de los marcadores superficiales de una población de CMM puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. A modo de ejemplo, pero no limitación, esta caracterización fenotípica puede realizarse por tinción de células

individuales. Tal tinción puede lograrse mediante el uso de anticuerpos. Esto puede ser tinción directa, usando un anticuerpo marcado o tinción indirecta, usando un segundo anticuerpo marcado contra un anticuerpo primario específico para el marcador celular. La unión del anticuerpo puede detectarse por cualquier método conocido en la técnica. La unión del anticuerpo también puede detectarse por citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia o radiografía.

Alternativamente o adicionalmente, un gen se considera que es expresado por una célula de la población de la invención si la expresión puede detectarse razonablemente después de 30 ciclos de PCR, que se corresponde con un nivel de expresión en la célula de al menos aproximadamente 100 copias por célula. Los términos “expresar” y “expresión” tienen significados correspondientes. A un nivel de expresión por debajo de este umbral, un marcador se considera que no se expresa. La comparación entre el nivel de expresión de un marcador en una célula madre adulta de la invención y el nivel de expresión del mismo marcador en otra célula, tal como, por ejemplo, una célula madre embrionaria, puede realizarse preferentemente comparando los dos tipos de células que han sido aislados de la misma especie. Preferentemente, esta especie es un mamífero, y más preferentemente esta especie es humana. Tal comparación puede realizarse convenientemente usando un experimento de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

La población de células CMM usada en la presente invención también puede caracterizarse porque las células no expresan una selección particular de marcadores a un nivel detectable. Como se define en el presente documento, se dice que estos marcadores son marcadores negativos. En algunos casos, la población de células madre de la invención se considera que no expresa un marcador si al menos aproximadamente el 70 % de las células de la población de células madre adultas aisladas no debe mostrar expresión detectable del marcador. En otros casos, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % o el 100 % de las células de la población de células madre no debe mostrar ninguna expresión detectable del marcador. De nuevo, el carecer de expresión detectable puede demostrarse mediante el uso de un experimento de RT-PCR o usando FACS.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede así comprender al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % (por número de células, o en peso o volumen de la composición), de CMM que no expresan uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más) de los marcadores CD34, CD11b, CD14, CD 15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133 a un nivel significativo.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede así comprender al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % (por número de células, o en peso o volumen de la composición), de CMM que no expresan uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, o ocho o más) de los marcadores CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD34, CD45, CD133 y HLAII a un nivel significativo.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede comprender al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % (por número de células, o en peso o volumen de la composición), de CMM que expresan uno o más (por ejemplo, dos o más, o los tres) de los marcadores c-Kit, vimentina y CD90 a un nivel significativo. En un caso preferido, una composición de la invención comprende el 95 % o más de células que expresan c-Kit, vimentina y CD90 a un nivel significativo.

La composición de la divulgación que comprende la invención puede comprender al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al

menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % (por número de células, o en peso o volumen de la composición), de CMM que no expresan uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o los seis) de los marcadores CD34, factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100 y queratina a un nivel significativo.

La concentración de CMM en la composición puede ser al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/ml, al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/ml, al menos aproximadamente  $10 \times 10^6$  células/ml, o al menos aproximadamente  $40 \times 10^6$  células/ml.

En algunos casos, al menos aproximadamente el 40 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %) de las CMM en una composición de la invención se pre-estimulan con el fin de potenciar uno o más de su capacidad de proliferación, capacidad de migración, capacidad de supervivencia, efecto terapéutico y propiedades inmunorreguladoras. En algunos casos, la pre-estimulación puede lograrse poniendo en contacto las CMM con una citocina. En algunos casos de la invención, la pre-estimulación puede lograrse poniendo en contacto las CMM con IFN- $\gamma$ .

En ciertos casos de la invención, las CMM pueden pre-estimularse usando una concentración de IFN- $\gamma$  entre 0,1 y 100 ng/ml. En casos adicionales, las CMM pueden pre-estimularse usando una concentración de IFN- $\gamma$  entre 0,5 y 85 ng/ml, entre 1 y 70 ng/ml, entre 1,5 y 50 ng/ml, entre 2,5 y 40 ng/ml, o entre 3 y 30 ng/ml. La pre-estimulación puede producirse durante un tiempo de estimulación más largo de aproximadamente 12 horas. La pre-estimulación puede producirse durante un tiempo de estimulación más largo de aproximadamente 13 horas, más largo de aproximadamente 18 horas, más largo de aproximadamente 24 horas, más largo de aproximadamente 48 horas, o más largo de aproximadamente 72 horas.

En algunos casos de la invención, las CMM pueden caracterizarse porque:

- a) no expresan marcadores específicos para células presentadoras de antígenos (APC),
- b) no expresan indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) constitutivamente, y
- c) expresan IDO tras la estimulación con interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ).

CMM útiles en el contexto de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la activación de linfocitos T. La activación de linfocitos T puede medirse por secreción de citocinas y proliferación de linfocitos T. Por ejemplo, las CMM de la invención dejan preferentemente de provocar la proliferación o secreción de IFN $\gamma$  cuando se co-cultivan con CMSP incompatibles. Las CMM de la invención también pueden inhibir la secreción de IFN $\gamma$  y la proliferación de la estimulación de CMSP con el superantígeno SEB.

Como se detalla en los ejemplos, se encontró que el tratamiento con CMM según la invención (en este caso, CEAh) protegía, de un modo dependiente de la dosis, contra la mortalidad producida por la inyección de endotoxinas y perforación cecal (Figura 7A) en un modelo de ratón de endotoxemia, y en este modelo también atenuó los signos clínicos de la septicemia, que incluyen letargo, diarrea, apañamiento y piloerección (no mostrada). La patogénesis del choque séptico se caracteriza por respuestas inflamatorias e inmunitarias anuladas que pueden conducir a daño del tejido, insuficiencia multiorgánica y muerte. La administración de CEAh a animales sépticos disminuyó los niveles de mediadores inflamatorios y aumentó IL-10 en los principales órganos afectados durante la septicemia (Figura 7B). Por consiguiente, las CMM usadas según la presente invención disminuyen los mediadores inflamatorios, que incluyen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o los siete de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN $\gamma$ , Rantes y MIP-2 en los principales órganos. Las CMM usadas según la invención también aumentan significativamente preferentemente el nivel de IL-10 en los principales órganos durante la septicemia. El tratamiento con CMM debe también disminuir significativamente la infiltración de células inflamatorias en la cavidad peritoneal, pulmón, hígado e intestino (véanse la Figura 7C y 7D).

Los resultados en los ejemplos indican que CEAh rescatan ratones de muerte endotoxémica regulando por disminución la respuesta inflamatoria agravada característica de este trastorno. El rescate de ratones de muerte endotoxémica aumenta al aumentar el número de células administradas. En este ejemplo, a una administración de 1 millón de células/ratón, el 60 % de los ratones sobrevivieron, a diferencia de ninguno de los ratones que no recibió células. El porcentaje de supervivencia puede aumentarse cuando el número de células inyectado en el ratón es elevado. Estos ejemplos proporcionan evidencia de que las CMM, en particular CEAh, pueden ser útiles en el tratamiento de SRIS, septicemia, septicemia grave, choque séptico y afecciones tipo septicemia.



Una composición de la invención puede contener la progenie de CMM. Tal progenie puede incluir generaciones posteriores de CMM, además de células comprometidas con linaje generadas induciendo la diferenciación de las CMM. Tal diferenciación puede inducirse *in vitro*. Se entenderá que las células de progenie pueden obtenerse después de cualquier número de pases de la población parental. Sin embargo, en ciertas realizaciones, las células de progenie pueden obtenerse después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o aproximadamente 10 pases de la población parental.

Una composición de la invención puede proporcionarse bajo condiciones estériles, y puede estar libre de virus, bacterias y otros patógenos. Una composición de la invención puede proporcionarse como una preparación libre de pirógenos.

En una realización, una composición de la invención puede prepararse para administración sistémica (por ejemplo, por vía rectal, por vía nasal, por vía oral, por vía vaginal, mediante un depósito implantado o mediante inhalación). En otra realización, una composición de la invención puede prepararse para administración local. Una composición de la invención puede administrarse por vía parenteral. Una composición puede administrarse por las vías subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intralinfática e intracraneal.

En un caso, las CMM usadas en la invención pueden ser autólogas con respecto al sujeto que va a tratarse. En otra realización, las CMM usadas en la invención pueden ser alogénicas o en otro caso las CMM pueden ser xenógenas con respecto al sujeto que va a tratarse. Estudios previos han mostrado que las células madre alogénicas del estroma derivadas de médula ósea y las células del estroma derivadas de tejido adiposo no provocan una respuesta inmunitaria a linfocitos cuando se ponen en contacto con linfocitos alogénicos *in vitro*. Por consiguiente, las células madre alogénicas del estroma derivadas de tejido adiposo derivadas de un donante pueden usarse teóricamente para el tratamiento de cualquier paciente, independientemente de la incompatibilidad del MHC. En realizaciones en las que se usan células madre alogénicas, puede requerirse tratamiento de apoyo. Por ejemplo, pueden administrarse inmunosupresores antes, durante y/o después del tratamiento para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), según métodos conocidos. Antes de la administración, las células también pueden modificarse para suprimir una reacción inmunitaria del sujeto a las células o viceversa, según métodos conocidos en la técnica.

En un caso, la composición de la invención puede administrarse mediante inyección o implantación de la composición en uno o más sitios diana en el sujeto que va a tratarse. En otro caso, la composición de la invención puede insertarse en un dispositivo de administración que facilita la introducción de la composición en el sujeto mediante inyección o implantación. En una realización, el dispositivo de administración puede comprender un catéter. En otro caso, el dispositivo de administración puede comprender una jeringa.

Las composiciones de la invención generalmente comprenderán un vehículo y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales vehículos y diluyentes son muy conocidos en la técnica, y pueden incluir: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y cera de supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Una composición de la invención puede ser estéril y fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Además, la composición puede ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal.

En una realización, la composición farmacéutica de la invención puede contener uno o más (o dos o más, o tres o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) agentes terapéuticos adicionales tales como un agente terapéutico seleccionado de los siguientes: un analgésico, tal como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un agonista opiáceo o un salicilato; un agente antiinfeccioso, tal como un antihelmíntico, un antianaeróbico, un antibiótico, un antibiótico de aminoglucósido, un antibiótico antifúngico, un antibiótico de cefalosporina, un antibiótico macrólido, un antibiótico  $\beta$ -lactámico, un antibiótico de penicilina, un antibiótico de quinolona, un antibiótico de sulfonamida, un antibiótico de tetraciclina, un antimicobacteriano, un antimicobacteriano antituberculoso, un antiprotozoico, un antiprotozoico antipalúdico, un agente antiviral, un agente antiretroviral, un escabicida, un agente antiinflamatorio, un agente antiinflamatorio corticosteroide, un antiprurítico/anestésico local, un antiinfeccioso tópico, un antiinfeccioso tópico antifúngico, un antiinfeccioso tópico antiviral; un agente electrolítico y renal, tal como un agente acidificante, un agente alcalinizante, un diurético, un diurético inhibidor de la anhidrasa carbónica, un diurético de asa, un diurético osmótico, un diurético ahorrador de potasio, un diurético de tiazida, una sustitución de electrolito y un agente

uricosúrico; una enzima, tal como una enzima pancreática y una enzima trombolítica; un agente gastrointestinal, tal como un anti diarréico, un antiemético, un agente antiinflamatorio gastrointestinal, un agente antiinflamatorio gastrointestinal de salicilato, un agente antiulceroso antiácido, un agente antiulceroso inhibidor de la bomba de ácido gástrico, un agente antiulceroso de la mucosa gástrica, un agente antiulceroso bloqueante de H<sub>2</sub>, un agente colestilolítico, un digestivo, un emético, un laxante y ablandador de heces, y un agente procinético; un anestésico general, tal como un anestésico de inhalación, un anestésico de inhalación halogenado, un anestésico intravenoso, un anestésico intravenoso barbitúrico, un anestésico intravenoso de benzodiazepina y un anestésico intravenoso agonista opiáceo; una hormona o modificador hormonal, tal como un abortivo, un agente suprarrenal, un agente suprarrenal de corticosteroide, un andrógeno, un antiandrógeno, un agente inmunobiológico, tal como una inmunoglobulina, un inmunosupresor, un toxoide y una vacuna; un anestésico local, tal como un anestésico local de amida y un anestésico local de éster; un agente musculoesquelético, tal como un agente antiinflamatorio antigotoso, un agente antiinflamatorio de corticosteroide, un agente antiinflamatorio de compuesto de oro, un agente antiinflamatorio inmunosupresor, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un agente antiinflamatorio de salicilato, un mineral; y una vitamina, tal como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

En otro caso, el agente terapéutico adicional puede ser un factor de crecimiento u otra molécula que afecta la proliferación o activación celular. En otro caso, ese factor de crecimiento puede inducir diferenciación final. En otro caso, el factor de crecimiento puede ser una variante o fragmento de un factor de crecimiento que existe de forma natural. Métodos de producción de tales variantes son muy conocidos en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, hacer cambios conservativos de aminoácidos, o por mutagénesis y ensayar la variante resultante para la funcionalidad requerida.

En una realización, las CMM pueden administrarse a un sujeto conjuntamente con uno o más (o dos o más, o tres o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, las CMM y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse al sujeto simultáneamente. En otros casos, las CMM y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse al sujeto secuencialmente. El uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse antes o después de la administración de las CMM.

La dosificación de CMM y cualquier agente terapéutico adicional variará dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse, la vía de administración, y la forma del agente terapéutico adicional. Las composiciones de la invención pueden administrarse en una dosis única o en dosis divididas. Dosificaciones apropiadas para CMM y cualquier agente terapéutico adicional pueden determinarse por técnicas conocidas.

El momento preciso de la administración y la cantidad de cualquier agente particular que dará el tratamiento más eficaz en un paciente dado dependerán de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad del agente, la condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de enfermedad, condición física general, sensibilidad a una dosificación dada y tipo de medicación), la vía de administración, etc. La información presentada en el presente documento puede usarse para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinar el momento óptimo y/o cantidad de administración, que no requerirá más que experimentación rutinaria, tal como monitorizar el sujeto y ajustar la dosificación y/o el momento preciso. Mientras que el sujeto está siendo tratado, la salud del sujeto puede monitorizarse midiendo uno o más de los índices relevantes en momentos predeterminados durante un periodo de 24 horas. Pautas de tratamiento, que incluyen dosificaciones, momentos de administración y formulaciones, pueden optimizarse según los resultados de tal monitorización.

El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más pequeñas que son inferiores a la dosis óptima. A partir de aquí, la dosificación puede aumentarse por pequeños incrementos hasta que se obtenga el efecto terapéutico óptimo.

El uso combinado de varios agentes terapéuticos puede reducir la dosificación requerida para cualquier componente individual debido a que la aparición y la duración del efecto de los diferentes componentes pueden ser complementarias. En tal terapia combinada, los diferentes agentes activos pueden administrarse juntos o por separado, y simultáneamente o en momentos diferentes dentro del día.

Será evidente para un experto en la materia que el método para la preparación de la composición de la invención no es limitante, y que las composiciones de la invención preparadas de ningún modo están incluidas dentro del alcance de la invención. En un caso, la invención proporciona un método de preparación de una composición de la invención, que comprende: (a) recoger CMM de un sujeto; (b) obtener una suspensión de células por tratamiento enzimático; (c) sedimentar la suspensión de células y resuspender las células en un medio de cultivo; (d) cultivar las células durante al menos aproximadamente 10 días; y (g) expandir las células durante al menos dos pases de cultivo.

Las CMM para su uso en la invención pueden aislarse de sangre periférica, médula ósea o tejido adiposo del sujeto en el que la composición de la invención va a introducirse. Sin embargo, las CMM también pueden aislarse de cualquier organismo de la misma especie o especie diferente de sujeto. Cualquier organismo con CMM puede ser un posible candidato. En una realización, el organismo puede ser de mamífero, y en otra realización el organismo es

humano.

En un caso preferido, pueden obtenerse CMM derivadas de adiposo esencialmente como se describe por Zuk et al., 2001. Según esta metodología, se obtienen lipoaspirados de tejido adiposo y las células derivadas del mismo. En el transcurso de esta metodología, las células pueden lavarse preferentemente para eliminar residuos contaminantes y glóbulos rojos, preferentemente con PBS. Las células se digieren preferentemente con colagenasa (por ejemplo, a 37 °C durante 30 minutos, 0,075 % de colagenasa; tipo I, Invitrogen, Carlsbad, CA) en PBS. Para eliminar los glóbulos rojos restantes, la muestra digerida puede lavarse (por ejemplo, con 10 % de suero bovino fetal), tratarse con 160 mmol/l de CINH4, y finalmente suspenderse en medio completo DMEM (DMEM que contiene 10 % de FBS, 2 mmol/l de glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina). Las células pueden filtrarse a través de una malla de nailon de 40 µm. Las células aisladas de esta forma pueden sembrarse (preferentemente 2-3x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) sobre matraces de cultivo de tejido y expandirse a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Las células se pasan preferentemente a un nuevo matraz de cultivo (1.000 células/cm<sup>2</sup>) cuando los cultivos alcanzan el 90 % de confluencia.

En ciertos casos, las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 25 días, o al menos aproximadamente 30 días. La expansión de células en cultivo puede mejorar la homogeneidad del fenotipo celular en la población de células.

En ciertos casos, las células se expanden en cultivo durante al menos tres pases de cultivo o "se someten a pases al menos tres veces". En otros casos, las células se someten a pases al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, o al menos diez veces. Las células pueden expandirse en cultivo indefinidamente a condición de que mejore la homogeneidad del fenotipo celular y se mantenga la capacidad diferencial.

Las células pueden cultivarse por cualquier técnica conocida en la técnica para el cultivo de células madre. Una discusión de diversas técnicas de cultivo, además de su aumento de escala, puede encontrarse en Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4th Edition, Wiley-Liss 2000. En ciertas realizaciones, las células se cultivan por cultivo en monocapa. Puede usarse cualquier medio capaz de soportar las CMM en cultivo de tejido. Formulaciones de medios que soportarán el crecimiento de CMM incluyen, pero no se limitan a, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo alfa modificado (αMEM) y medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (medio 1640 de RPMI). Normalmente, se añadirá 0 al 20 % de suero bovino fetal (FBS) al medio anterior con el fin de soportar el crecimiento de células del estroma. Sin embargo, podría usarse un medio definido si los factores de crecimiento, citocinas y hormonas necesarios en FBS para las células del estroma y condrocitos se identificaran y proporcionaran a concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, que incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, compuestos mitogénicos o diferenciadores para células del estroma. Las células de la invención pueden cultivarse a temperaturas entre 31 °C y 37 °C en una estufa de incubación humidificada. El contenido de dióxido de carbono puede mantenerse entre el 2 % y el 10 % y el contenido de oxígeno puede mantenerse entre el 1 % y el 22 %. Las células pueden permanecer en este entorno durante periodos de hasta aproximadamente 4 semanas.

Los antibióticos que pueden añadirse al medio incluyen, pero no se limitan a, penicilina y estreptomicina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo químicamente definido puede ser aproximadamente 10 a aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomicina en el medio de cultivo químicamente definido puede ser aproximadamente 10 a aproximadamente 200 µg/ml.

En un caso, las CMM de la invención pueden transfectarse establemente o transducirse transitoriamente con un ácido nucleico de interés usando un plásmido, estrategia de vector viral o alternativo. Los ácidos nucleicos de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellos que codifican productos génicos que potencian la producción de componentes de la matriz extracelular encontrados en el tipo de tejido que va a repararse, por ejemplo, pared intestinal o pared vaginal.

La transducción de vectores virales que llevan genes reguladores en las células madre del estroma pueden realizarse con vectores virales, que incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, retrovirus o virus adeno-asociados purificados (por ejemplo, por bandeado con cloruro de cesio) a una multiplicidad de infección (unidades virales:célula) de entre aproximadamente 10:1 y 2000:1. Las células pueden exponerse al virus en medio libre de suero o que contiene suero en ausencia o presencia de un detergente catiónico tal como polietilenimina o Lipofectamine™ durante un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas (Byk T. et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B. et al. (1999) Calcif. Tissue Int. 64:45-49).

Otros métodos adecuados para transferir vectores o plásmidos en células madre incluyen complejos de lípido/ADN, tales como aquellos descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5.578.475; 5.627.175; 5.705.308; 5.744.335; 5.976.567; 6.020.202; y 6.051.429. Reactivos adecuados incluyen Lipofectamine, una formulación de liposomas 3:1 (peso/peso) del lípido poli-catiónico trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminocarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) (nombre de registro de Chemical Abstracts: trifluoroacetato de N-[2-(2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxpentil)amino]etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanaminio), y el lípido neutro fosfatidiletanolamina de

- 5 dioleófilo (DOPE) en agua filtrada en membrana. A modo de ejemplo es la formulación Lipofectamine 2000™ (disponible de Gibco/Life Technologies N.º 11668019). Otros reactivos incluyen: reactivo de transfección FuGENETM 6 (una mezcla de lípidos en forma no liposómica y otros compuestos en 80 % de etanol, obtenible de Roche Diagnostics Corp. N.º 1814443); y el reactivo de transfección LipoTAXITM (una formulación lipídica de Invitrogen Corp., N.º 204110). La transfección de células madre puede realizarse por electroporación, por ejemplo, como se describe en M.L. Roach y J.D. McNeish (2002) *Methods in Mol. Biol.* 185:1. Sistemas de vector viral adecuados para producir células madre con alteraciones genéticas estables pueden basarse en adenovirus y retrovirus, y pueden prepararse usando componentes de virus comercialmente disponibles.
- 10 La transfección de vectores plasmídicos que llevan genes reguladores en las CMM puede lograrse en cultivos en monocapa por el uso de métodos de precipitación de ADN con fosfato de calcio o de detergente catiónico (Lipofectamine™, DOTAP) o en cultivos tridimensionales por la incorporación de los vectores de ADN de plásmido directamente en el polímero biocompatible (Bonadio J. et al. (1999) *Nat. Med.* 5:753-759).
- 15 Para el seguimiento y la detección de proteínas funcionales codificadas por estos genes, los vectores de ADN viral o de plásmido pueden contener un gen de marcador fácilmente detectable, tal como la proteína verde fluorescente o enzima beta-galactosidasa, ambas de las cuales pueden seguirse por medios histoquímicos.

La invención se ilustrará ahora adicionalmente por los siguientes ejemplos.

20

## EJEMPLOS

### 1. Materiales y métodos - Preparación de células

#### 25 1.1 Células madre mesenquimatosas (CMM)

Se obtuvieron CMM derivadas de adiposo humano (CEAh) esencialmente como se ha descrito (Zuk et al 2001), y se prepararon esencialmente como se ha descrito en el documento WO2006/037649. Brevemente, lipoaspirados obtenidos de tejido adiposo humano se lavaron dos veces con PBS para eliminar residuos contaminantes y glóbulos rojos, y se digirieron a 37 °C durante 30 minutos con 0,075 % de colagenasa (tipo I, Invitrogen, Carlsbad, CA) en PBS. La muestra digerida se lavó con 10 % de suero bovino fetal (FBS), se trató con 160 mmol/l de CINH<sub>4</sub> para eliminar los glóbulos rojos restantes, se suspendió en medio completo DMEM (DMEM que contiene 10 % de FBS, 2 mmol/l de glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina) y se filtró a través de una malla de nailon de 40 µm. Las células se sembraron (2-3x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) sobre matraces de cultivo de tejido y se expandieron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Las células se pasaron a un nuevo matraz de cultivo (1.000 células/cm<sup>2</sup>) cuando los cultivos alcanzaron el 90 % de confluencia. Se usaron un total de seis muestras diferentes con duplicados de población 6-9 en el estudio.

#### 40 1.1.1 Inducción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por interferón-gamma (IFN-γ)

Se aislaron CMM de tejido adiposo humano (CEA), se sembraron sobre placas de cultivo de tejido a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron durante 48 horas en las condiciones previamente descritas para la expansión de células. Se añadieron los siguientes estímulos inflamatorios a una porción de las células, como se muestra en la Figura 4:

45

- Interleucina-1 (IL-1): 3 ng/ml
- Interferón-gamma (IFN-γ): 3 ng/ml
- Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α): 5 ng/ml
- Lipopolisacárido (LPS): 100 ng/ml

50

Las células se incubaron en presencia del estímulo correspondiente durante un periodo que oscila de 30 minutos a 48 horas, y entonces se recogieron por digestión con tripsina, y se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM (fluoruro de fenil-metilsulfonilo), EDTA 1 mM (ácido etilendiaminatetraacético), 5 µg/ml de aprotinina, 5 µg/ml de leupeptina, 1 % de Triton x-100, 1 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS) que contiene inhibidores de la proteasa. Los lisados celulares se sometieron a análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal específico de IDO (IgG monoclonal de ratón, clon 10.1, de *Upstate cell signaling solutions*). Se aisló ARN de las células tratadas, y se analizó por transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando cebadores específicos para el ADNc de IDO (Nº de acceso de GenBank M34455 (GI:185790))

60

Directo: 5' GGATTCTTCCTGGTCTCTATTGG 3'  
 inverso: 5' CGGACTGAGGGATTTGACTCTAATG 3'

#### 65 1.1.2 Reparación de células madre de lipoaspirados con homogeneidad mejorada

Se sembraron células a baja densidad en DMEM más 10 % de FBS sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos.

Las células se lavaron con PBS y se fijaron en acetona durante 10 min a -20 °C. Para la tinción de  $\alpha$ -actina, las células se fijaron en 4 % de paraformaldehído durante 10 min a TA. Después del bloqueo con PBS que contenía 4 % de suero de cabra y 0,1 % de Triton X-100, las células se incubaron a 4 °C durante la noche con anticuerpos primarios contra los siguientes marcadores celulares a las diluciones indicadas: (i) alfa-actina; Dako, Glostrup, Dinamarca; 1/50; (ii) vimentina; Sigma, St. Louis, EE.UU.; 1/200; (iii) CD 90; CYMBUS, Biotechnology LTD, Chandlers Ford, Hants, RU; 1/50; (iv) factor VIII; Dako; 1/100; (v) CD 34; Chemicon, CA, EE.UU.; 1/100; (vi) c-Kit; Chemicon; 1/100; (vii) desmina; Dako; 1/100; (viii) citoqueratina; Dako; 1/100 y (ix) S-100; Dako; 1/50. A continuación, las células se incubaron con los apropiados segundos anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o conjugados con cloruro de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma; 1/50) durante 45 min a TA. Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), las células se montaron en Mobiglow (MoBiTec, Gottingen, Alemania) y se observaron con un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon, Tokio, Japón). En cada caso, se determinó el número de células inmunopositivas, y se comparó con el número de núcleos teñidos. Se exportaron campos aleatoriamente seleccionados a un ordenador (MacIntosh G3; Apple Computer Inc., Cupertino, Ca, EE.UU.) mediante una cámara SpotI (Diagnostic Instruments Inc., Tampa, FL, EE.UU.). Se usaron células de músculo liso aórtico humano, células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y fibroblastos sinoviales humanos como controles positivos para la inmunotinción con los diversos anticuerpos.

En el pase 1, un alto porcentaje (90-95 %) de células madre del estroma derivadas de adiposo expresaron vimentina, un marcador de células citoesqueléticas mesenquimatosas (Figura 1). La expresión de vimentina se mantuvo al mismo nivel hasta e incluyendo el pase 9. Los niveles de otros marcadores disminuyeron con el tiempo. Por ejemplo, la  $\alpha$ -actina, que se encontró en el 17 % de las células derivadas de LPA en el pase 1, ya no fue detectable en el pase 7. El marcador de células endoteliales, factor de von Willebrandt (factor VIII), y CD34, que también se encuentra sobre la superficie de células endoteliales, solo se detectaron en los pases 1 a 3 (7 % y 12 % de células inmunopositivas, respectivamente). Por el contrario, la expresión de c-Kit (CD 117), un marcador de proliferación celular, aumentó con el tiempo, con el 99 % de células inmunopositivas del pase 4 en adelante (Figura 2). El marcador de fibroblastos CD90, inicialmente expresado en aproximadamente el 80 % de las células derivadas de LPA, se encontró en el 99 % de las células a partir del pase 6. No se observó expresión del marcador neuroectodérmico S100 o el marcador ectodérmico queratina en ninguna de las células derivadas de LPA en ningún momento. El cambio en los marcadores observados a medida que aumenta el número de pases indica un aumento en la homogeneidad de la preparación de células obtenida.

Para cuantificar el crecimiento celular, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>.

Después de haberse unido las células al sustrato (3 h), el medio de cultivo se sustituyó por DMEM complementado con 1 % de antibióticos más 0,5 %, 2 %, 5 % o 10 % de FBS. Como controles positivos para probar cada lote de suero, también se cultivaron células madre del estroma derivadas de adiposo humano y se determinaron sus tasas de crecimiento. El medio se sustituyó cada dos días. A intervalos de 24 h, las células se fijaron con 1 % de glutaraldehído y el número de células por pocillo se determinó por tinción nuclear con cristal violeta, y monitorizando la absorbancia a 595 nm. Se construyó una curva patrón para establecer la relación entre el número de células por pocillo y la absorbancia a 595 nm ( $r^2=0,99$ ).

Con el fin de analizar las células en una manera más normalizada y menos subjetiva, las células también se sometieron a análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). En general, el análisis de citometría de flujo permite la detección de antígenos de superficie por anticuerpos, que están directamente (covalentemente) o indirectamente (marcado de anticuerpo fluorescente secundario) enlazados a un marcador fluorescente. Por otra parte, el análisis inmunohistoquímico anteriormente descrito requiere la permeabilización de las células y la posterior unión al anticuerpo. Así, lo último requiere un protocolo individualmente optimizado que depende de la proteína diana y el anticuerpo. Además, debido a la permeabilización de la membrana celular, no es posible distinguir entre proteínas de marcador internamente y externamente expresadas.

El protocolo usado en la inmunocitometría para la detección de antígenos de superficie está normalizado, y solo requiere controles negativos apropiados. Además, el análisis de FACS permite una evaluación del porcentaje de células positivas y el nivel de expresión. Estas evaluaciones son solo de naturaleza subjetiva usando inmunohistoquímica, y pueden variar de experimento a experimento, que no se produce con el análisis de FACS.

Tal caracterización inmunofenotípica de las células puede realizarse sobre células recién aisladas y después de periodos de cultivos, por ejemplo, después de 7 días, 4 semanas y 3 meses en cultivo. El análisis de marcadores superficiales en diferentes momentos permite la evaluación de la homogeneidad del fenotipo durante el cultivo. Ejemplos de este análisis y datos que demuestran el fenotipo obtenido de las muestras obtenidas de 3 donantes sanos de cero a tres meses de cultivo se describen en detalle en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/065.461, presentada el 25 de febrero de 2005.

Después del aislamiento por el método anteriormente descrito, las células madre del estroma derivadas de adiposo de uno de los pacientes se caracterizaron por la presencia/ausencia de una serie de marcadores superficiales. Para hacer esto, se monitorizó la expresión de los siguientes marcadores superficiales por citometría de flujo:

- 5 Integrina: CD11b, CD18, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD61, CD104.  
 Marcadores hematopoyéticos: CD3, CD9, CD10, CD13, CD 16, CD 14, CD 19, CD28, CD34, CD38, CD45, CD90, CD133, glicoforina.  
 Receptores de factores de crecimiento: CD105, NGFR.  
 10 Receptores de la matriz extracelular: CD15, CD31, CD44, CD50, CD54, CD62E, CD62L, CD62P, CD102, CD106, CD146, CD166.  
 Otros: CD36, CD55, CD56, CD58, CD59, HLA-I, HLA-II,  $\beta$ 2-microglobulina.

15 Las células que van a caracterizarse se recogieron por digestión suave con tripsina, se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con marcadores de anticuerpo marcado con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) contra cada uno de los marcadores superficiales que iban a analizarse. Los marcadores celulares se lavaron e inmediatamente se analizaron usando el citómetro Epics-XL (Coulter). Como controles, las células se tiñeron con anticuerpos no específicos de los isótopos correspondientes marcados con FITC o PE. A partir del análisis del perfil de expresión de marcadores superficiales (Figura 3A/3B), los criterios usados para determinar qué marcadores definen la población de células y permiten que se identifique y se diferencie con respecto a otros tipos de célula fueron los siguientes:

- 25 1. Desechar aquellos marcadores que varían de una muestra a otra o con el tiempo durante el cultivo en la experimentación hecha con células madre del estroma derivadas de adiposo de donantes sanos en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/065.461, presentada el 25 de febrero de 2005.  
 2. Seleccionar los marcadores en función de su relevancia biológica, desechar marcadores característicos de tipos específicos de células (por ejemplo, CD3 es un marcador exclusivo para linfocitos).

30 Aplicando estos criterios, la población de células madre multipotentes se caracteriza como que es positiva para la expresión de CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105; y que carece de expresión de CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133.

### 1.2 Células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

35 Se aislaron CMSP de preparaciones de capa leucocitaria derivadas de la sangre completa de voluntarios sanos por sedimentación por densidad sobre gradientes de Ficoll-Hypaque (20 min, 2000 rpm, a temperatura ambiente). Las células recuperadas de la interfase del gradiente se lavaron dos veces en medio completo 1640 de RPMI (que consiste en medio 1640 de RPMI complementado con 8 % de suero de AB humano, L-glutamina 2 mM, 1 % de piruvato de sodio, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de penicilina/estreptomina y 1 % de 2-mercaptoetanol) y se usaron inmediatamente para el cultivo o purificación adicional. Para aislar linfocitos T, las CMSP se agotaron en células adherentes por incubación con mAb anti-CD8, -CD14, -CD19, -CD20 y -CD56 (todos de Coulter Immunotech) durante 1 h a 4 °C, seguido de incubación durante 1 h a 4 °C con perlas magnéticas recubiertas anti-IgG de ratón. Las células unidas a las perlas se eliminaron de CMSP con un dispositivo magnético. Para minimizar la estimulación de células, todas las etapas de purificación se llevaron a cabo en ausencia de suero. La pureza de linfocitos T fue >96 % como se evalúa por citometría de flujo. Se aislaron linfocitos T CD4+ por selección negativa de las CMSP totales usando el kit de aislamiento de CD4 (Miltenyi Biotec), dando una población de células CD4+ con pureza del 94-98 %.

### 1.3 Cultivo celular

50 Se cultivaron linfocitos T CD4+ ( $5 \times 10^4$ ) y diversos números de o bien monocitos, DC o bien CMSP completas en presencia o ausencia del superantígeno enterotoxina E estafilocócica (SEB, 1 ng/ml, Sigma), y en presencia o ausencia de números indicados de CEAh en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, Corning, NY). Después de 72-96 h de cultivo, la proliferación celular se evaluó usando un ensayo de proliferación celular (BrdU) de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). El contenido de citocinas en sobrenadantes de cultivo se determinó por ELISA de sándwich específicos como más adelante. Algunos cultivos se realizaron en presencia de anticuerpos neutralizantes contra HGF $\beta$  (10  $\mu$ g/ml) o IL-10 (10  $\mu$ g/ml), indometacina (20  $\mu$ mol/l) o TNF $\alpha$  recombinante (20 ng/ml) o IFN $\gamma$  (200 ng/ml) (todos de BD Pharmingen, San Jose, CA y R&D Systems, Mineápolis, MN). Para determinar la dependencia de la respuesta supresora del contacto con las células, se dispusieron CMSP estimuladas con SEB ( $10^5$ ) en el inserto superior de un sistema Transwell (Millipore, 0,4  $\mu$ m de poro), y CEAh ( $2 \times 10^4$ ) en ausencia o presencia de CMSP ( $5 \times 10^4$ ) de una tercera persona irradiadas (30 Gy) en el pocillo inferior. En el día 4 se determinó la respuesta proliferativa de las CMSP en el compartimento superior. Para producir sobrenadantes de cultivos de CEAh, las CEAh ( $10^5$ ) se estimularon en un matraz de 25 cm<sup>2</sup> durante 24 h con TNF $\alpha$  (20 ng/ml), IFN $\gamma$  (200 ng/ml) o ambos, o durante 4 días con CMSP alógenas ( $2 \times 10^6$ ). Los sobrenadantes se recogieron, se filtraron a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m y se añadieron a cultivos de CMSP activados con SEB.

Para medir la capacidad supresora de los linfocitos T generados en presencia de CEAh, los linfocitos T se aislaron de cultivos de CEA-CMSP activados con SEB después de 4 días por selección inmunomagnética positiva con anticuerpos monoclonales anti-CD3 marcados con perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Se recuperaron células viables por centrifugación en gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed Pharma AS), se dejaron reposar durante 2 días en medio completo de RPMI complementado con IL-2 (20 U/ml) y se añadieron a diferentes relaciones en un cultivo secundario a linfocitos T estimulados con Ab anti-CD3 (5 µg/ml).

#### 1.4 Caracterización de las CMM

La caracterización de células se realizó usando células en los pases de cultivo 1 a 25. Las células de tejido adiposo se analizaron por medio de citometría de flujo usando anticuerpos marcados con un marcador fluorescente (es decir, por inmunocitometría de fluorescencia) para la presencia/ausencia de una serie de marcadores superficiales, que incluyeron:

- 15 - Marcadores de células presentadoras de antígenos (APC): CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII.
- Marcadores de células endoteliales: CD31.
- Otros marcadores: CD9, CD34, CD90, CD44, CD54, CD105 y CD133.

Los anticuerpos usados en el ensayo de citometría de flujo fueron los siguientes:

- 20 - CD9: clon MM2/57 IgG2b de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD11b: clon ICRF44 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD11c: clon BU 15 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD14: clon UCHM1 IgG2a de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- 25 - CD31: clon WM59 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD34: clon QBEND 10 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD44: clon F10-44-2 IgG2a de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD45: clon F10-89-4 IgG2a de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD54: clon 15.2 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- 30 - CD90: clon F15-42-1 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD105: clon SN6 IgG1 de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec); y
- Anti-HLA humano clase II DP, DQ, DR: clon WR18 IgG2a de ratón - anticuerpo marcado con FITC (Serotec);
- CD 133: clon 293C3 IgG2b de ratón - PE anticuerpo marcado (Miltenyi Biotec).

Las células analizadas (Figura 5) fueron positivas para CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105, y negativas para CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD34, CD45, CD 133 y HLAII. Las células fueron negativas para todos los marcadores probados que son específicos para los linajes endoteliales o de APC (CD11b, CD11c, CD14, CD45 y HLAII).

#### 40 1.5 Determinación de citocinas y de hormonas

Para la determinación de citocinas en mucosa de colon, se aislaron extractos de proteína mediante homogeneización de segmentos colónicos (50 mg de tejido/ml) en 50 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4, con 0,5 mmol/l de DTT, y 10 µg/ml de una mezcla de inhibidores de proteinasa que contienen fluoruro de fenilmetilsulfonilo, pepstatina y leupeptina (Sigma). Las muestras se centrifugaron a 30.000 g durante 20 min y se guardaron a -80 °C hasta la determinación de las citocinas. Los niveles de citocinas, quimiocinas y HGF en el suero, extractos de proteína colónica y sobrenadantes de cultivo se determinaron por ELISA de sándwich específicos usando Ab de detección de captura/biotinilados de BD Pharmingen (San Diego, CA) y R&D Systems (Mineápolis, MN) según las recomendaciones del fabricante. Los niveles de PGE<sub>2</sub> y HGF en sobrenadantes de cultivo se determinaron usando un kit de inmunoensayo enzimático competitivo (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Para el análisis intracelular de citocinas en células MLN estimuladas, se estimularon 10<sup>6</sup> células/ml con PMA (10 ng/ml) más ionomicina (20 ng/ml) durante 8 h, en presencia de monensina. Las células se tiñeron con mAb PerCP-anti-CD4 durante 30 min a 4 °C, se lavaron, se fijaron/permeabilizaron en saponina con Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson), se tiñeron con 0,5 µg/muestra de mAb específicos anti-citocina conjugados con FITC y PE (BD Pharmingen), y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur. Con el fin de distinguir entre fuentes de monocitos/macrófagos y linfocitos T, se hizo exclusivamente análisis de citocinas intracelulares en la población de linfocitos T Cd4 marcada con PerCP.

#### 1.6 Ensayo de mieloperoxidasa

60 Se monitorizó la infiltración de neutrófilos en el colon midiendo la actividad de mieloperoxidasa (MPO) como se ha descrito previamente (Buras et al. (2005) Nature Reviews: Drug Discovery 4(10), 854 - 865). Brevemente, se homogeneizaron segmentos colónicos a 50 mg/ml en tampón fosfato (50 mmol/l, pH 6,0) con 0,5 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Las muestras se congelaron y se descongelaron 3 veces, se centrifugaron a 30.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron 1:30 con tampón de ensayo que consistía en 50 mmol/l de tampón fosfato a pH 6,0 con 0,167 mg/ml de o-dianisidina (Sigma) y 0,0005 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y la reacción colorimétrica se midió a 450 nm entre 1 y 3 min en un espectrofotómetro (Beckman Instruments, Irvine, CA). La actividad de MPO

por gramo de tejido húmedo se calculó como: actividad de MPO (U/g de tejido húmedo) =  $(A_{450}) (13,5)/\text{peso de tejido (g)}$ , en la que  $A_{450}$  es el cambio en la absorbancia de luz a 450 nm de 1 a 3 min después del inicio de la reacción. El coeficiente 13,5 se determinó empíricamente tal que 1 U de actividad de MPO represente la cantidad de enzima que reducirá 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido/min.

### 1.7 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de  $n$  experimentos o ratones por grupo. Se aplicó la prueba de la U de Mann-Whitney para comparar datos no paramétricos para la significación estadística en todos los resultados clínicos y experimentos de cultivo de células. Los cambios en el peso corporal se compararon usando la prueba del orden con signo de pares comparados de Wilcoxon. La supervivencia se analizó por la prueba del orden logarítmico de Kaplan-Meier.  $P < 0,05$  se consideró significativo.

### 2. Ejemplos 1 – CEAh muestran potentes actividades inmunomoduladoras

En este estudio se probó la capacidad de las CEAh para inhibir la activación de linfocitos T, como se mide por la secreción de citocinas y la proliferación de linfocitos T. Las CEAh dejaron de provocar la proliferación o secreción de IFN $\gamma$  cuando se co-cultivaron con CMSP incompatibles (no mostradas). Además, las CEAh inhibieron significativamente la secreción de IFN $\gamma$  y la proliferación de CMSP estimulada con el superantígeno SEB (Figura 6). Este efecto inhibitor se correlacionó directamente con el número de CEAh añadidas al co-cultivo (Figura 6), y fue independiente de la concentración de SEB (no mostrado).

### 3. Ejemplo 2 - Inducción de SRIS por LPS y CLP (ligadura cecal y punción)

Para inducir endotoxemia, se inyectaron i.p. ratones Balb/c con LPS (400  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ). Los ratones se trataron i.p. con medio o CEAh ( $10^5$ - $10^6$  células cuando se indique) 30 min después de la inyección de LPS.

Los animales se monitorizaron cada 12 h para la supervivencia y otros signos clínicos que incluyen pelaje alborotado, letargo, aparición de diarrea, pérdida de peso corporal. Algunos animales se sacrificaron en diferentes momentos después de la inyección de LPS, se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca, se recogieron exudados peritoneales, hígado, pulmones e intestinos delgados. Los especímenes de tejido se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para la extracción de proteína y la determinación de citocinas, y la medición de la actividad de MPO. La suspensión peritoneal se centrifugó durante 5 min a 1800 g, y se contaron las células peritoneales y se ajustaron en PBS/3 mmol/l de medio EDTA a  $3 \times 10^6$  células/ml. El número de células viables en las diferentes subpoblaciones peritoneales se determinó por citometría de flujo (FACScan; BD Biosciences, Mountain View, CA). Brevemente, se seleccionaron linfocitos peritoneales, macrófagos y neutrófilos según sus diferentes características de dispersión hacia adelante y lateral y se contaron.

Además del modelo de endotoxemia inducida por LPS de dosis alta, se usó el modelo de CLP de peritonitis, ya que éste se considera que es el modelo experimental más fiable para septicemia humana y una prueba preclínica crítica para cualquier nuevo tratamiento de septicemia grave.

El tratamiento con CEAh protegió de un modo dependiente de la dosis contra la mortalidad producida por inyección de endotoxina y perforación cecal (Figura 7A) y atenuó los signos clínicos de la septicemia, que incluyen letargo, diarrea, apiñamiento y piloerección (no mostrada). La patogénesis del choque séptico se caracteriza por respuestas inflamatorias e inmunitarias anuladas que pueden conducir a daño del tejido, insuficiencia multiorgánica y muerte. La administración de CEAh a animales sépticos disminuyó los niveles de mediadores inflamatorios (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN $\gamma$ , Rantes y MIP-2) y aumentó IL-10 en los principales órganos afectados durante la septicemia (Figura 7B). Finalmente, el tratamiento con CEAh disminuyó la infiltración de células inflamatorias en la cavidad peritoneal, pulmón, hígado e intestino (Figura 7C y 7D). Estos resultados indican que las CEAh rescatan a los ratones de la muerte endotoxémica, regulando por disminución la respuesta inflamatoria agravada característica de este trastorno.

Estos ejemplos proporcionan evidencia de que las CMM, en particular CEAh, pueden ser útiles en el tratamiento de SRIS, septicemia, septicemia grave, choque séptico y afecciones tipo septicemia.

La mayoría de las estrategias terapéuticas para SRIS, septicemia y choque séptico hasta la fecha se han dirigido a mediadores pro-inflamatorios, y no se ha demostrado que sean enormemente satisfactorias en ensayos clínicos. Las terapias diseñadas para bloquear una única citocina, por ejemplo, TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , han mostrado eficacia limitada debido al perfil cinético temprano y transitorio de estas citocinas inflamatorias. Ahora se ha encontrado que la administración de células madre mesenquimatosas (CMM), en particular células madre del estroma derivadas de tejido adiposo humano (CEAh), protege contra la mortalidad en dos modelos *in vivo* de endotoxemia grave y septicemia, proporcionando evidencia de que las CMM pueden ser útiles en el tratamiento de SRIS, septicemia y choque séptico. Se ha encontrado que las CMM funcionan a varios niveles para regular aspectos cruciales de SRIS, que incluyen mediante la reducción de niveles sistémicos de diversas citocinas y quimiocinas inflamatorias, y por inhibición de la infiltración de leucocitos en diversos órganos diana.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende células madre del estroma derivadas de tejido adiposo (CEA), para su uso en el tratamiento de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) en un sujeto.
- 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el SRIS es septicemia, septicemia grave, choque séptico o una afección tipo septicemia.
- 10 3. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos aproximadamente el 50 % de las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo expresan uno o más de los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105.
- 15 4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos aproximadamente el 50 % de las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo no expresan uno o más de los marcadores CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD133.
- 20 5. La composición para su uso según cualquiera de reivindicación precedentes, en la que las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo se administran sistémicamente.
- 25 6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo se administran localmente.
- 7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo son alógenas con respecto al sujeto que va a tratarse.
- 30 8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células madre del estroma derivadas de tejido adiposo se administran conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**FIGURA 1**

Antígeno	P1	P3	P4	P6	P7	P9
<b>CD 34</b> (marcador de células madre)	+	+/-	-	-	-	-
<b>CD 90</b> (marcador de células madre, fibroblastos)	+	++	++	+++	+++	+++
<b>c-Kit</b> (marcador de células madre)	+	+	++	+++	+++	+++
<b>Factor VIII</b> (marcador de diferenciación)	+	+/-	+/-	-	-	-
<b>Alpha-actin</b> (marcador de las células del músculo liso vascular)	+	+	+/-	-	-	-
<b>Vimentin</b> (marcador de origen mesodermo; células mesenquim)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Desmin</b> (marcador de origen mesodermo; células musculares)	+	-	-	-	-	-
<b>S-100</b> (marcador de origen neuroectodérmico)						
<b>Keratin</b> (marcador de origen ectodérmico)						

**FIGURA 2**

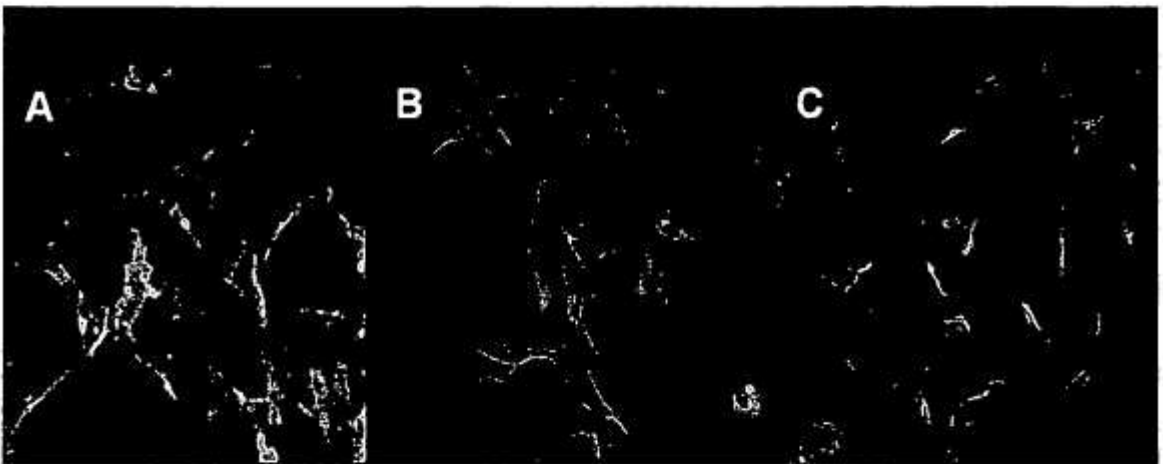


FIGURA 3 A

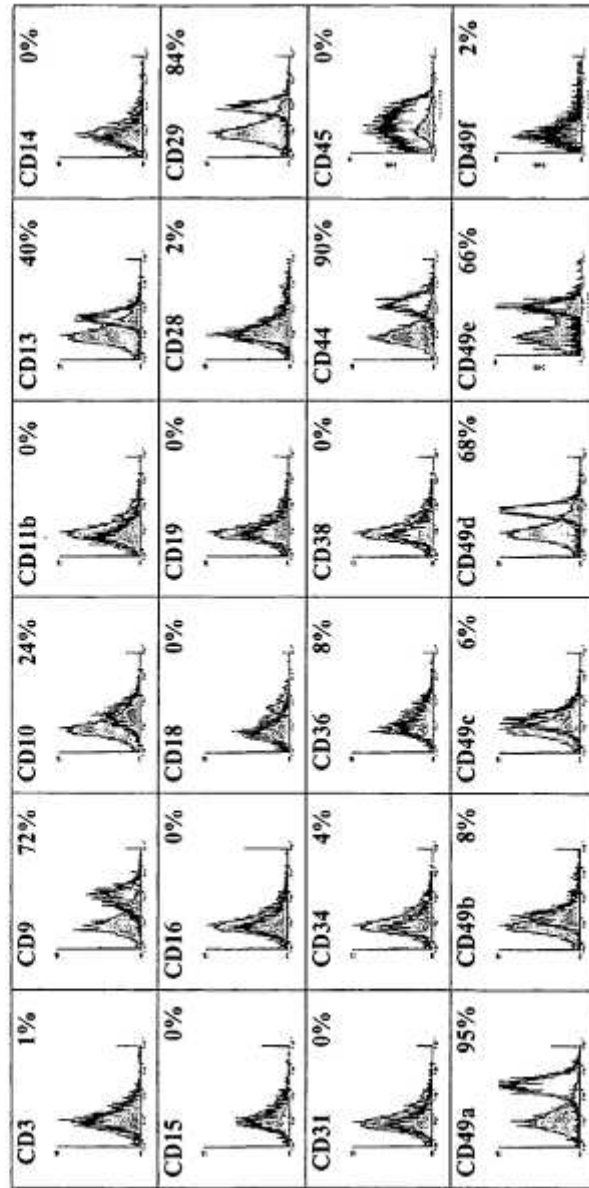


FIGURA 3 B

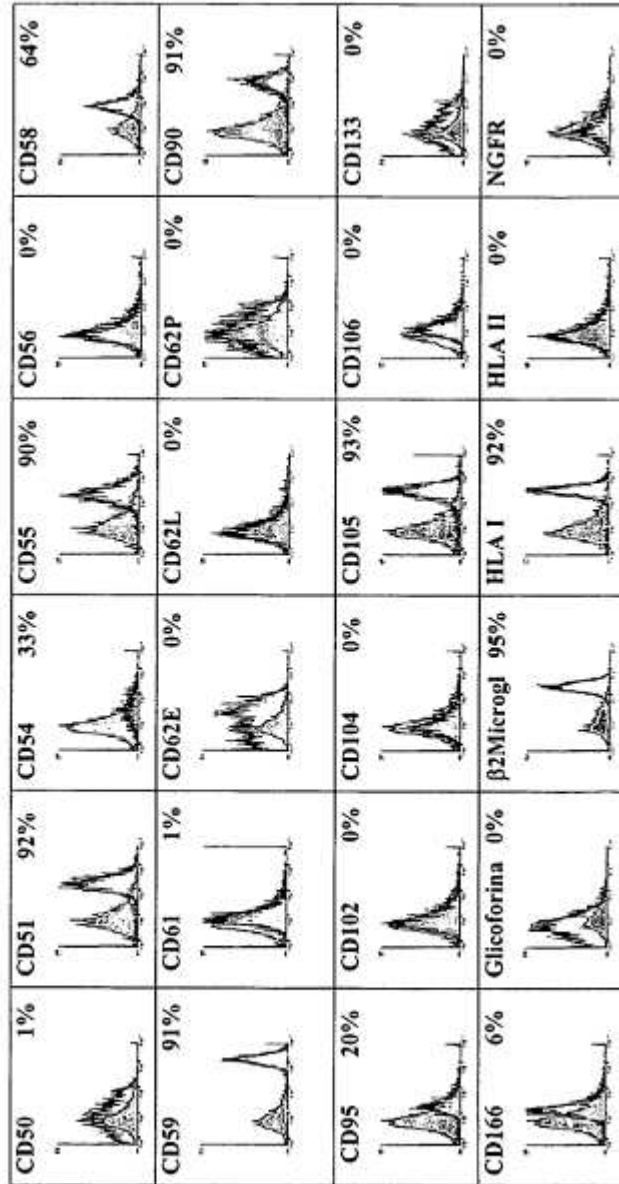
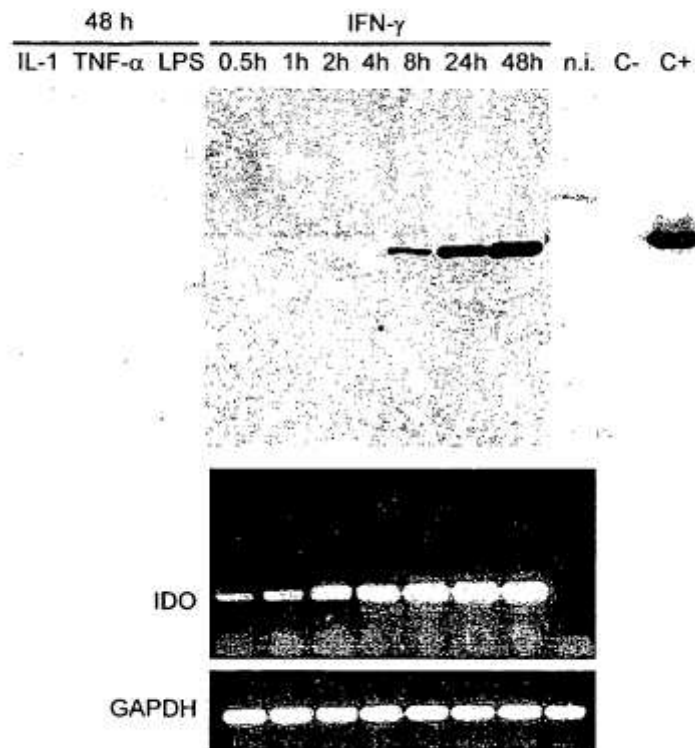


FIGURA 4



**FIGURA 5**

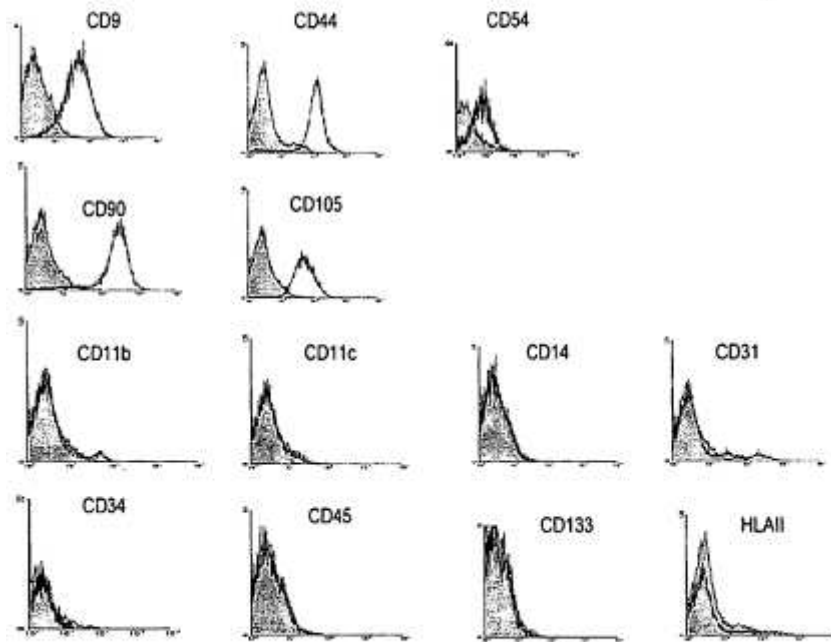


FIGURA 6

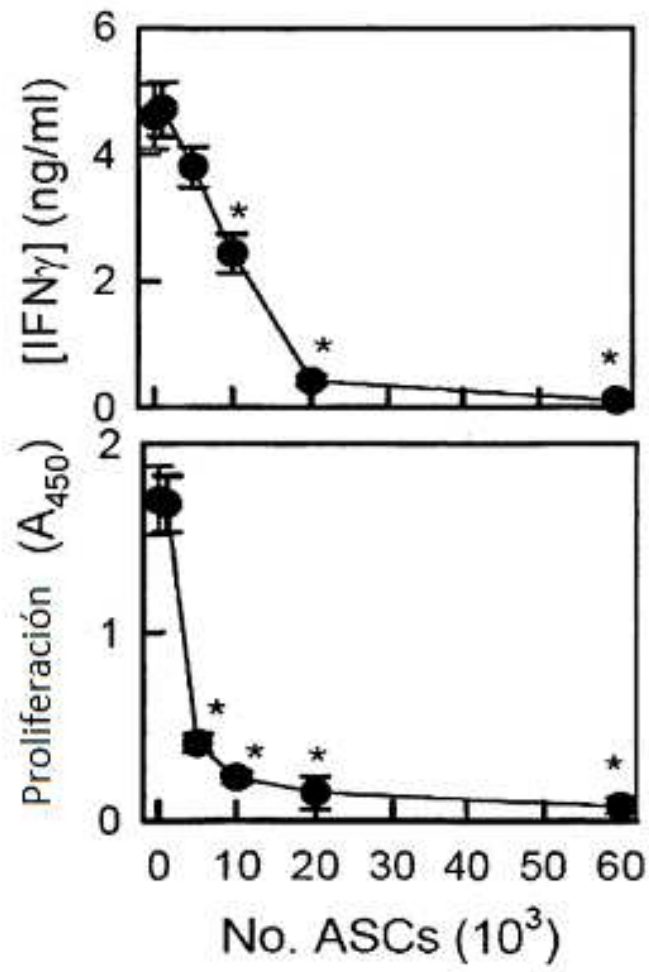




FIGURA 7

