

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 494**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/00** (2006.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/EP2014/053923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14131877**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14707170 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2961430**

54 Título: **Protección del endotelio vascular de las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente con células progenitoras humanas CD34-negativo**

30 Prioridad:

**01.03.2013 EP 13157426**

**28.03.2013 EP 13161666**

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

**21.12.2017**

73 Titular/es:

**APCETH GMBH & CO. KG (100.0%)**

**Max-Lebsche-Platz 30**

**81377 München, DE**

72 Inventor/es:

**EISSNER, GÜNTHER;**

**GUENTHER, CHRISTINE y**

**HUSS, RALF**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 647 494 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

Protección del endotelio vascular de las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente con células progenitoras humanas CD34-negativo

5

**Campo de la invención.**

Esta invención se refiere a las células madre mesenquimales CD34-negativo humanas para su uso médico en el tratamiento de afecciones clínicas.

10

**Antecedentes de la invención**

Las células progenitoras CD34-negativo del ser humano adulto son células multipotentes con la capacidad de auto renovarse y de diferenciación multilínea en varios tejidos de la variedad hematopoyética, endotelial y mesenquimal.

15

Las células progenitoras CD-34 negativo han estado asociadas con el potencial inmunomodulatorio y regenerativo, lo que las hace interesantes para su uso como agente terapéutico celular a la hora de tratar enfermedades en seres humanos.

20

Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2008/150368 A1 divulga el uso médico de células madre CD-34 negativo no modificadas genéticamente en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, diabetes, distrofia muscular, y cicatrización de heridas graves en cirugía o traumas físicos. Singer y Caplan describen mecanismos de acción putativos de las células madre mesenquimales humanas en la inflamación (N. G. Singer and A. I. Caplan: "Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation", Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011, 457-478).

25

Tolar et al. revisan las controversias y observaciones recientes en la biología de las CMM, la regulación de todas las respuestas por las CMM en modelos preclínicos, y la experiencia clínica con la infusión CMM (J. Tolar, K. Le Blanc, A. Keating, B. R. Blazar: "Concise Review: Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells", Stem Cells 2010, 28, 1446-1455).

30

Roemeling-van Rhijn et al. proporciona resultados de investigaciones preclínicas y clínicas con CMM en trasplante de órganos sólidos (M. Roemeling-van Rhijn, W. Weimar, M. J. Hoogduijn: "Mesenchymal Stem Cells: Application for Solid Organ Transplantation", Current Opinion in Organ

35

Transplantation, 2012, 17, 55-62). De forma similar, Hoogduijn et al. evalúan la progresión de la terapia con células madre mesenquimales en el trasplante clínico de órganos (M. J. Hoogduijn, F. C. Popp, A. Grohnert, M. J. Crop, M. van Rhijn, A. T. Rowshani, E. Eggenhofer, P. Renner, M. E. Reinders, T. J. Rabelink, L. J. van der Laan, F. J. Dor, J. N. Ijzermans, P. G. Geenever, C. Lange, A. Durrbach, J. H. Houtgraaf, B. Christ, M. Seifert, M. Shagidulin, V. Donckier, R. Deans, O. Ringden, N. Perico, G. Remuzzi, A. Bartholomew, H. J. Schlitt, W. Weimar, C. C. Baan, M. H. Dahlke, y el grupo de estudio MISOT: "Advancement of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Solid Organ Transplantation (MISOT)", Transplantation, 90, 2010, 124-126).

40

LeBlanc y colaboradores investigaron si las células madre mesenquimales podían mejorar la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) tras un trasplante de células madre hematopoyéticas (K. Le Blanc, F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M. E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R. M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, O. Ringdén, Comité de

45

Desarrollo del Grupo Europeo para el trasplante de sangre y médula ósea: "Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Steroid Resistant, severe, acute Graft-versus-Host-Disease: A Phase Two Study", Lancet, 2008, 371, 1579-86).

50

Pati y colaboradores sugirieron que las CMM pueden abordar terapéuticamente la permeabilidad e inflamación vascular a través de efectos locales y sistémicos en los pulmones inducidos por shock hemorrágico (S. Pati, M. H. Gerber, T. D. Menge, K. A. Wataha, Y. Zhao, J. A. Baumgartner, J. Zhao, P. A. Letourneau, M. P. Huby, L. A. Baer, J. R. Salsbury, R. A. Kozar, C. A. Wade, P. A. Walker, P. K. Dash, C. S. Cox Jr, M. F. Doursout, J. B. Holcomb: "Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock", PLoS One, 2011, 6, e25171).

55

Charbord revisa las múltiples características de las células madre mesenquimales de la médula ósea incluyendo las capacidades estromales e inmunomodulatoria, que pueden ser responsables de la versatilidad de los mecanismos de reparación del tejido dañado (P. Charbord: "Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts", Human Gene Therapy, 2010, 21, 1045-56).

60

El interés clínico cada vez mayor en las células progenitoras CD-34 negativo está acompañado de una fuerte necesidad de mejorar la comprensión de su potencial terapéutico y de un uso médico más estratificado de estas células multifuncionales.

65

**Resumen de la invención**

70

Esta invención se define en las presentes reivindicaciones y proporciona células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso como un medicamento para proteger el endotelio vascular de las reacciones citotóxicas mediadas por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

75

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

80

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

85

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

90

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

95

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

100

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

105

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

110

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

115

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

120

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

125

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

130

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

135

mediada por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad

140

inflamatoria vascular.

Además, en el presente se divulga un procedimiento para producir células madre mesenquimales CD34-negativo para el uso arriba mencionado, que comprende los pasos de procedimiento de

- 5 1. a) aislar las células madre mesenquimales CD34-negativo,
  2. b) aumentar las células madre mesenquimales CD-34 negativo durante al menos 12 días en un medio de cultivo celular,
  3. c) recolección de las células madre mesenquimales CD34-negativo.
- 10 Esta invención además proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de las células madre mesenquimales CD34-negativo para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente preparando una muestra que comprende células diana, Linfocitos T citotóxicos CD8+ y células madre mesenquimales CD34-negativo y una muestra de referencia que comprende células diana endoteliales y Linfocitos T citotóxicos CD8+ sin células madre mesenquimales CD34-negativo, y comparar la lisis de las células
- 15 diana endoteliales en la muestra y en la muestra de referencia.

### **Breve descripción de los dibujos**

20 La Figura 1 es un diagrama de bloque que muestra un diseño experimental representativo del procedimiento para determinar la capacidad de las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente.

La Figura 2 muestra el resultado de la protección de las células endoteliales a partir de lisis específica mediante Linfocitos T citotóxicos CD8+ por las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención usando células madre/estromales mesenquimales de la médula ósea de diferentes donantes.

25 La Figura 3 muestra que la lisis de las células endoteliales mediante CTL CD8+ está restringida por MHC de clase I y es independiente de la actividad de la célula asesina natural o la célula asesina activada por linfoquinas.

La Figura 4 muestra que la protección de las células endoteliales contra la lisis por los Linfocitos T citotóxicos CD8+ alogénicos es específica a las CMM de la médula ósea (CMM-MO), mientras que las células de control con coincidencia de tamaño no exhiben un efecto protector.

La Figura 5 muestra el resultado de la comparación de la nivel de protección endotelial por las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención usando células madre/estromales mesenquimales derivadas de varios tejidos.

### **Términos y definiciones**

En esta solicitud, se utilizan ciertos términos que tienen los significados indicados a continuación.

40 Como se utiliza en el presente, una célula es "alógena" con respecto al sujeto si ella, o cualquiera de sus células precursoras, es de otro sujeto de la misma especie.

Como se utiliza en el presente, "célula progenitora CD34-negativo" significará una célula que carece de CD34 en su superficie. Las células progenitoras CD34-negativo como tal también dan lugar o se diferencian en células madre/estromales CD34-negativo. Las células progenitoras CD34-negativo pueden comprender progenie hematopoyética, endotelial y/o mesenquimal. En ciertas realizaciones preferidas, "célula progenitora CD34-negativo" significará una célula madre/estromal mesenquimal CD34-negativo (CMM); mientras que las células progenitoras hematopoyéticas y también endoteliales eventualmente empiezan a expresar CD34 y otros marcadores simultáneos durante su maduración.

50 Como se utiliza en el presente, "endotelio vascular" incluirá, con limitación, células que revisten la superficie interior de los vasos sanguíneos. En particular, el endotelio vascular comprende células endoteliales en contacto directo con la sangre.

55 Como se utiliza en el presente, "reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente" significará, sin limitación, la respuesta inmune mediada por la célula que provoca el daño o la muerte de la célula diana a la cual se dirige la respuesta inmune. En ciertas realizaciones, las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente incluirán inmunidad celular mediada por MHC.

60 Como se utiliza en el presente "célula madre/estromal mesenquimal CD34-negativo" significará una célula madre

que cumple los tres criterios mínimos propuestos por la Sociedad de terapia celular: (1) adherencia plástica cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar utilizando matraces para el cultivo de tejidos; (2) expresión de CD105, CD73 y CD90, según la medición realizada mediante citometría de flujo, y falta de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19; (3) capacidad para diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones de diferenciación *in vitro* estándar (M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, E. Horwitz: "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy*, 2006, 8, 315-7).

- 10 En ciertas realizaciones, "célula madre/estromal mesenquimal CD34-negativo" significará adicionalmente una CMM que expresa B7-H1 (PD-L1) tras la estimulación con Interferón gamma (M. Najar, G. Raicevic, H.F. Kazan, C. De Bruyn, D. Bron, M. Toungouz, L. Lagneaux: "Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming", *Stem Cell Rev.* 2012, 8, 1188-98); S. Tipnis, C. Viswanathan, A.S. Majumdar: "Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO", *Immunol Cell Biol.*, 2010, 88, 795-806; P. Fiorina, M. Jurewicz, A. Augello, A. Vergani, S. Dada, S. La Rosa, M. Selig, J. Godwin, K. Law, C. Placidi, R.N. Smith, C. Capella, S. Rodig, C.N. Adra, M. Atkinson, M.H. Sayegh, R. Abdi: "Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes", *J Immunol.* 2009, 183, 993-1004; C.J. Chang, M.L. Yen, Y.C. Chen, C.C. Chien, H.I. Huang, C.H. Bai, B.L. Yen: "Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma", *Stem Cells*, 2006, 24, 2466-77).

Además que se especifique adicionalmente, "enfermedad inflamatoria vascular" significará, sin limitación, una respuesta inmune que desencadena la inflamación del tejido vascular, incluyendo arterias mayores y menores, venas y vasos linfáticos.

Como se utiliza en el presente, "sujeto" significará cualquier animal, como un humano, primate no humano, ratón, rata, cobaya o conejo. Preferiblemente, el sujeto es humano.

- 30 Como se utiliza en el presente, "proteger el endotelio vascular" significará ralentizar, detener o revertir la progresión de las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente hacia cualquier tejido vascular.

**Descripción de la invención**

35 El endotelio vascular es el principal objetivo en una variedad de enfermedades inflamatorias vasculares. Los inventores de la presente invención se dieron cuenta de que la protección específica del endotelio en términos de una profilaxis individualizada adaptada al riesgo y/o intervención terapéutica sería de un gran valor económico a nivel clínico y de salud.

40 Los inventores realizaron una investigación elaborada del estado de activación y la vitalidad del endotelio vascular y descubrieron que las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden inhibir las reacciones citotóxicas específicas del endotelio en un uso farmacológico y dependiente de la dosificación.

Por tanto, en un primer aspecto, esta invención proporciona células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso como medicamento para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas por el Linfocito T citotóxico CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado con, una enfermedad inflamatoria vascular.

En una realización de la invención, la enfermedad inflamatoria vascular comprende la lisis de la célula específica del endotelio vascular causada por los linfocitos T citotóxicos CD8+. Los inventores dilucidaron que el endotelio era un objetivo directo para los linfocitos T citotóxicos CD8+ en ciertas condiciones de la enfermedad inflamatoria vascular.

El uso terapéutico de las células madre mesenquimales CD34-negativo fue particularmente efectivo a la hora de interferir con las reacciones citotóxicas mediadas por el Linfocito T citotóxico CD8+.

55 En una realización específica de la invención, los linfocitos T citotóxicos CD8+ comprenden linfocitos T citotóxicos específicos del endotelio que son CD27-negativo y CD28-negativo. Los inventores descubrieron sorprendentemente pruebas de la existencia de linfocitos T citotóxicos específicos del endotelio que son CD27-negativo y CD28-negativo y no reconocen objetivos hematopoyéticos. Estas células exhiben características fenotípica y funcionalmente notables. Por ejemplo, su actividad lítica se mejora mediante los linfocitos T reguladores CD4+/CD25+/FoxP3+ (TRegs). Los inventores consiguieron una inhibición significativa de la lisis de la célula endotelial mediante este tipo

concreto de CTL cuando se administraron células madre mesenquimales CD34-negativo.

Esta invención por tanto proporciona un uso terapéutico estratificado de las células madre mesenquimales CD34-negativo, permitiendo una profilaxis individualizada, adaptada al riesgo y/o una terapia con células madre mesenquimales CD34-negativo. Por tanto, el uso médico ventajoso de las células madre mesenquimales CD34-negativo de acuerdo con la presente invención incluye las condiciones clínicas definidas a continuación.

En una realización de esta invención, la enfermedad inflamatoria vascular comprende una aloreactión contra el endotelio vascular de un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto, y/o vasculitis aguda, inflamatoria o alérgica como resultado de una respuesta autoinmune y/o inflamación crónica del endotelio vascular.

En otra realización, la enfermedad inflamatoria vascular comprende complicaciones relacionadas con el trasplante tras el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas, donde las complicaciones relacionadas con el trasplante comprende preferiblemente la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y/o enfermedad microangiopática.

Por ejemplo, las complicaciones relacionadas con el trasplante comprenden la enfermedad injerto contra huésped (EICH). En particular, la enfermedad injerto contra huésped puede caracterizarse por el daño predominantemente selectivo del tracto gastrointestinal, el hígado, la piel incluyendo la mucosa, el sistema pulmonar y una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones de la invención, la enfermedad injerto contra huésped comprende EICH aguda o crónica esteroide refractaria.

Otro ejemplo de complicaciones relacionadas con el trasplante es la enfermedad microangiopática, como por ejemplo, enfermedad venooclusiva hepática (EVOH).

Las células mesenquimales CD34-negativo también pueden usarse para proteger el endotelio vascular en la enfermedad inflamatoria vascular que comprende vasculitis aguda, inflamatoria o alérgica como resultado de una respuesta autoinmune. Este uso incluye, sin limitación, granulomatosis alérgica, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, arteritis Takayasu, enfermedad de Kawasaki, tromboangiitis obliterante (enfermedad de Buerger), poliarteritis nodosa, Síndrome de Gurg-Strauss, poliangiitis microscópica, vasculitis crioglobulinémica, vasculitis urticarial, enfermedad de Behcet, síndrome de Goodpasture, vasculitis post-infecciosa, vasculitis inducida por medicamentos.

En otra realización, la enfermedad inflamatoria vascular comprende inflamación crónica del endotelio vascular. La inflamación crónica puede, por ejemplo, comprender aterosclerosis. La inflamación crónica también puede comprender vasculitis asociada con la enfermedad reumatoide.

De acuerdo con la invención, las células progenitoras CD34-negativo comprenden células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo. Las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir de un grupo que comprende células madre mesenquimales CD34-negativo de médula ósea, cordón umbilical, tejido adiposo y una combinación de las mismas. En una realización preferida de la invención, las células madre mesenquimales CD34-negativo son células madre mesenquimales CD34-negativo de médula ósea.

Preferiblemente, las células madre mesenquimales CD34-negativo tienen la capacidad de reducir las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente contra las células endoteliales vasculares en al menos un 50% en comparación con las células endoteliales sin protección por las células mesenquimales CD34-negativo. Un procedimiento adecuado para la determinación de la reducción de las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente de acuerdo con la presente invención se detalla más adelante.

Las células madre mesenquimales CD34-negativo se adaptan, preferiblemente aunque no exclusivamente, para su inyección en el torrente sanguíneo del sujeto, por ejemplo introduciendo dichas células en una de las venas o arterias del sujeto mediante inyección. Dicha administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez o una pluralidad de veces y/o durante uno o más periodos prolongados. Se prefiere una única inyección, pero en algunos casos puede ser necesario repetir las inyecciones a lo largo del tiempo.

Preferiblemente, las células madre mesenquimales CD34-negativo se mezclan con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica, e incluyen, sin limitación, solución reguladora de fosfato con molaridad del 0,01 al 0,1 y preferiblemente con una molaridad de 0,05 o salino al 0,8%. Además, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser

soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas; ejemplos de disolventes no acuosos son el propileno, glicol, glicol de polietileno, aceites vegetales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones y suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo salino y medio regulador. Los vehículos parenterales incluyen solución de fluoruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de dextrosa y de sodio, solución láctica de Ringer, y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos como dextrosa de Ringer, aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. Los fluidos usados comúnmente para la administración intravenosa pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, page 808, Lippincott, Williams and Wilkins (2000).

10

Pueden utilizarse diferentes regímenes de administración. Preferiblemente, las células madre mesenquimales CD34-negativo se adaptan para su inyección en el torrente sanguíneo del sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede, por ejemplo, comprender un espectro de  $1 \times 10^2$  hasta aproximadamente  $1 \times 10^8$  células por kilogramo de peso corporal, desde aproximadamente  $1 \times 10^3$  hasta aproximadamente  $10 \times 10^7$  células por kilogramo de peso corporal, desde aproximadamente  $1 \times 10^4$  hasta aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal, desde aproximadamente  $1 \times 10^4$  hasta aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por kilogramo de peso corporal, desde aproximadamente  $1 \times 10^5$  hasta aproximadamente  $0,5 \times 10^5$  células por kilogramo de peso corporal, desde aproximadamente  $1 \times 10^3$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $5 \times 10^5$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células por kilogramo de peso corporal. Se ha observado que estas cifras son particularmente terapéuticamente efectivas en el trasplante de células madre mesenquimales CD34-negativo.

25

En una variante de la invención, las células madre mesenquimales CD34-negativo se utilizan de forma preventiva para proteger el endotelio vascular de un sujeto en riesgo de sufrir enfermedad inflamatoria vascular. Como se utiliza en el presente, el uso preventivo incluirá, sin limitación, la administración de las células a un sujeto que está a punto de recibir un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto. En otro ejemplo, el uso preventivo comprende administrar células madre mesenquimales CD34-negativo a un sujeto que está a punto de recibir un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas. Otro ejemplo de uso preventivo comprende administrar células madre mesenquimales CD34-negativo a un sujeto que ha recibido un trasplante alogénico pero no ha desarrollado aún complicaciones endoteliales. Un riesgo de enfermedad inflamatoria vascular puede, por ejemplo, también comprender una afección genética, una enfermedad autoinmune, cáncer, tabaquismo, alcoholismo y una combinación de los mismos. Los inventores comprendieron que la protección objetivo del endotelio vascular en el sentido de una profilaxis individualizada adaptada al riesgo es de un gran valor económico clínico y para la salud.

30

35

Dicho uso estratificado del riesgo puede comprender, por ejemplo, pero sin limitación, que un paciente en riesgo de desarrollar complicaciones endoteliales tras un trasplante recibirá células madre mesenquimales CD34-negativo profilácticamente, es decir, por adelantado. Por ejemplo, las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden administrarse a un sujeto inmediatamente antes de, durante y hasta aproximadamente seis semanas antes y/o después de una intervención, por ejemplo, un trasplante de órgano o de célula alogénica. La administración de células madre mesenquimales CD34-negativo puede también ampliarse sobre la etapa aguda y/o crónica de las complicaciones endoteliales hasta aproximadamente 100 días después de la intervención. Además, las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden administrarse terapéuticamente a un sujeto tras desarrollar o haber desarrollado actualmente complicaciones endoteliales y/o síntomas característicos de las mismas.

40

45

Las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden ser alogénicas con respecto al sujeto. Las células madre mesenquimales CD34-negativo también pueden ser autólogas con respecto al sujeto. Alternativamente, puede utilizarse una combinación de células madre mesenquimales CD34-negativo alogénicas y autólogas.

50

En un ejemplo, las células madre mesenquimales CD34-negativo son autólogas con respecto al trasplante de órgano sólido y alogénicas con respecto al sujeto. En otro ejemplo, las células madre mesenquimales CD34-negativo son alogénicas con respecto al trasplante de célula madre hematopoyética y autólogas con respecto al sujeto. También se incluyen casos donde las células madre mesenquimales CD34-negativo son alogénicas con respecto al sujeto y el trasplante de órgano sólido o el trasplante de célula madre hematopoyética.

55

En una realización, las células madre mesenquimales CD34-negativo se utilizan en combinación con al menos un componente activo adicional. Por ejemplo, el al menos un componente activo adicional puede tener una actividad farmacológica seleccionada del grupo que comprende actividad anti-inflamatoria, actividad anti-isquémica, actividad

60

anti-trombótica y combinaciones de las mismas. Además o alternativamente, el al menos un componente activo adicional puede tener la capacidad de evitar impedir el alorreconocimiento y/o lisis de las células endoteliales. En ciertos ej empleos, el al menos un componente activo comprende un derivado de ácido de soxirribonucleico, por ejemplo Defibrotide.

5

También se divulga en el presente un procedimiento para producir células madre mesenquimales CD34-negativo humanas para cualquiera de los anteriores usos, comprendiendo los pasos del procedimiento de a) aislar las células madre mesenquimales CD34-negativo, b) aumentar las células madre mesenquimales CD34-negativo durante al menos 12 días en un medio de cultivo celular, c) recolección de las células madre mesenquimales CD34-negativo..

10

Las células madre mesenquimales CD34-negativo de la invención pueden aislarse del tejido del grupo que comprende médula ósea, cordón umbilical, placenta y tejido adiposo o combinaciones de los mismos en un paso de procedimiento a). Los inventores descubrieron que las células madre mesenquimales de estas fuentes de tejido son particularmente adecuadas para proteger el endotelio vascular en la enfermedad inflamatoria vascular.

15

Preferiblemente, las células madre mesenquimales CD34-negativo son células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo. Más preferiblemente son células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo de la médula ósea.

Como se ha divulgado en el presente, el medio de cultivo celular del paso del procedimiento b) incluye un medio que comprende

20

- Un lisado plaquetario humano libre de materia orgánica con más de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro, donde el lisado constituye entre el 2% y el 15% del volumen total del medio de cultivo celular,
- un filtrado de plasma fresco congelado (FFP) humano libre de materia orgánica con más de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro, donde el filtrado FFP constituye entre el 1% y el 10% del volumen total del medio de cultivo celular,
- heparina con una concentración de entre 0 U/ml y 10 U/ml del medio de cultivo celular,
- L-glutamina a una concentración de entre 0,5 mM a 10 mM, y
- un medio libre de sérum y bajo el glucosa adecuado para el cultivo celular mamífero, donde el medio libre de sérum y bajo en glucosa constituye entre el 75% y el 97% del volumen total del medio de cultivo celular.

25

30

En el presente, el plasma fresco congelado humano se refiere a la parte líquida de la sangre humana que ha sido centrifugada, separada y congelada sólida a  $-18^{\circ}\text{C}$  o menos a pocas horas de su recogida. Los inventores consiguieron la expansión de las células madre mesenquimales CD34-negativo en este medio que son particularmente potentes a la hora de proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente. A partir de ahora, este medio se denominará medio "Bio-1".

35

Tal como se divulga en el presente, las células madre mesenquimales CD34-negativo se recogen en el paso del procedimiento c) que están predominantemente creciendo de forma adherente sobre una superficie en contacto con un medio de cultivo celular, como las paredes de un plato de cultivo celular o un contenedor para el cultivo celular.

40

Preferiblemente, los pasos del procedimiento a) hasta c) se realizan bajo Buenas prácticas de manufactura (GMP) y/o Buenas prácticas de manufactura actuales (cGMP).

Con estos procedimientos, los inventores consiguieron el crecimiento *in vitro* y la selección positiva de células mejor definidas y altamente trasplantables, con una potencia de protección del endotelio vascular particularmente alta, mientras que los procedimientos convencionales normalmente arrojan una mezcla heterogénea de subpoblaciones distintas en las células progenitoras CD34-negativo.

45

50

En otro aspecto, esta invención además proporciona un procedimiento para determinar la capacidad de las células madre mesenquimales CD34-negativo para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente preparando una muestra que comprende células diana, Linfocitos T citotóxicos CD8+ y células madre mesenquimales CD34-negativo y una muestra de referencia que comprende células diana endoteliales y Linfocitos T citotóxicos CD8+ sin células madre mesenquimales CD34-negativo, y comparar la lisis de las células diana endoteliales en la muestra y en la muestra de referencia.

55

En una realización, las células diana endoteliales y/o las células madre mesenquimales CD34-negativo son alogénicas con respecto a los Linfocitos T CD8+.

En otra realización, los Linfocitos T CD8+ son co-cultivados con células endoteliales alogénicas en la presencia de

Interleucina-2 (IL-2) antes de preparar la muestra y la muestra de referencia con las células diana endoteliales y dichos Linfocitos T CD8+. El co-cultivo puede, por ejemplo, mantenerse durante al menos un día, preferiblemente durante al menos tres días, más preferiblemente durante al menos cinco días, y aún más preferiblemente durante al menos siete días.

5

En otra realización, se añade al menos un componente activo adicional a la muestra y/o a la muestra de referencia. Por ejemplo, el al menos un componente activo adicional puede tener una actividad farmacológica seleccionada del grupo que comprende actividad anti-inflamatoria, actividad anti-isquémica, actividad anti-trombótica y combinaciones de las mismas. Además o alternativamente, el al menos un componente activo adicional puede tener la capacidad de evitar impedir el reconocimiento y/o lisis de las células endoteliales. En ciertos ejemplos, el al menos un componente activo comprende un derivado del ácido desoxirribonucleico, por ejemplo Defibrotide.

10

Con este procedimiento, los inventores consiguieron un ensayo de potencia para evaluar la capacidad de las células madre mesenquimales CD34-negativo de diferentes orígenes a la hora de proteger el endotelio vascular. Además, se realizó una prueba *in vitro* para la predicción positiva del efecto terapéutico de las células madre mesenquimales CD34-negativo *in vivo*.

15

El procedimiento puede usarse también para analizar la sangre del sujeto para comprobar la presencia y/o actividad patofisiológica de los Linfocitos T citotóxicos endoteliales CD8+ antes de, durante y/o después de recibir un trasplante y/o desarrollar complicaciones endoteliales.

20

Por ejemplo, en el caso de un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto, las células diana endoteliales pueden comprender células derivadas del donante del órgano sólido. En otro caso de un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto, las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden comprender células derivadas del donante del órgano sólido. En ciertos casos en un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto, las células diana endoteliales y las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden comprender células derivadas del donante del órgano sólido. Además o alternativamente, las células madre mesenquimales CD34-negativo también pueden comprender células que se derivan de al menos un donante externo que no es el sujeto o el donante del órgano sólido.

25

30

En el caso de un trasplante de célula madre hematopoyética alogénica, las células diana endoteliales pueden comprender células derivadas del sujeto, es decir, el receptor del trasplante. En otro caso de trasplante de célula madre hematopoyética alogénica, las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden comprender células derivadas del receptor del trasplante. En ciertos casos de trasplante de célula madre hematopoyética alogénica, las células diana endoteliales y las células madre mesenquimales CD34-negativo pueden comprender células derivadas del receptor del trasplante. Además o alternativamente, las células madre mesenquimales CD34-negativo también pueden comprender células que se derivan de al menos un donante externo que no es el receptor del trasplante o el donante de la célula madre hematopoyética.

35

De esta forma, el procedimiento no solo puede usarse para determinar la susceptibilidad de un sujeto a desarrollar reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente de forma individual usando Linfocitos T citotóxicos CD8+ derivados de la sangre del sujeto en combinación con las células diana endoteliales específicas del caso identificadas anteriormente, sino también para seleccionar células madre mesenquimales CD34-negativo que exhiben una protección particularmente potente de las células diana endoteliales.

40

Como resultado, los pacientes pueden, por ejemplo, estratificarse de acuerdo con su riesgo de enfermedad inflamatoria vascular. Además, puede concebirse una profilaxis y/o terapia individualizada.

#### **Descripción detallada de las realizaciones**

50

En los siguientes ejemplos, ciertas realizaciones de la invención serán explicadas con más detalle con referencias a las figuras y a los datos experimentales. Los ejemplos y las figuras no tienen la intención de ser limitativos con respecto a los detalles específicos.

#### **EJEMPLO 1: Ensayo de citotoxicidad de diseño experimental**

55

El siguiente ejemplo describe una configuración experimental diseñada por los inventores para evaluar la potencia de las células progenitoras CD34-negativo de la invención con respecto a la protección del endotelio vascular contra reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente.

60

La Figura 1 es un diagrama de bloque que ilustra una relación representativa del ensayo de citotoxicidad de la presente invención. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC, 10), pueden usarse como origen de las células citotóxicas. Las PBMC pueden, por ejemplo, derivarse de un donante externo sano. Alternativamente, pueden usarse las PBMC del sujeto a ser tratado.

5

A continuación, las PBMC pueden seleccionarse para los Linfocitos T CD8+ (11). La selección de Linfocitos T CD8+ puede, por ejemplo, comprender el enriquecimiento de Linfocitos T CD8+ de las PBMC por inmunoseparación. La inmunoseparación puede, por ejemplo, comprender una selección negativa de Linfocitos T CD8+ eliminando los Linfocitos T no CD8+. Un método adecuado para el enriquecimiento de los Linfocitos T CD8+ es, por ejemplo, la selección intacta mediante micropartículas inmunomagnéticas. Las células no deseadas pueden identificarse para su eliminación con complejos anticuerpo que reconocen CD4, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66B, CD123, TCR $\gamma/\delta$ , glicoforina A y partículas magnéticas revestidas de dextrano. Tras esto, la pureza fenotípica de las células seleccionadas puede verificarse mediante, por ejemplo, una citometría de flujo. Preferiblemente, la mayoría de las células seleccionadas son Linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL, 12).

15

En la siguiente fase, puede mantenerse un co-cultivo (14) de CTL CD8+ con células estimuladoras endoteliales (13) que son alogénicas con respecto a CTL CD8+. Preferiblemente, las células estimuladoras endoteliales son incapaces de realizar la mitosis. Una línea celular adecuada es, por ejemplo la línea de célula endotelial microvascular transformada con el antígeno T grande SV40 CDC/EU.HMEC-1 (HMEC). El co-cultivo de las células simuladoras endoteliales y el CTL CD8+ puede, por ejemplo, mantenerse durante aproximadamente siete días. Preferiblemente, el co-cultivo además comprende simular el CTL CD8+ con Interleucina-2.

20

Una preparación de células diana endoteliales (17) puede someterse a un paso de etiquetado (18) en el cual se etiquetan con una primera etiqueta representando las células diana endoteliales distinguibles de otras células no diana. Por ejemplo, dicha etiqueta puede comprender un compuesto fluorescente que tiene diferentes características de emisiones cuando es tá presente en la membrana de plasma de una célula que cuando está fuera de la membrana de plasma. Un compuesto adecuado es, por ejemplo, 3, 3' dioctadeciloxacarbocianina perclorato (DIOC18<sub>3</sub>). Las células diana pueden ser, por ejemplo, células endoteliales de tejido de trasplante. Las células diana pueden ser una línea celular endotelial, por ejemplo la línea endotelial microvascular CDC/EU.HMEC-1.

30

En la siguiente fase, se prepara una muestra (22) combinando una primera parte de las células diana etiquetadas (20), una primera parte de las células efectoras (16), y las células progenitoras CD34-negativo (21) de la presente invención. Las células progenitoras CD34-negativo de la invención pueden, por ejemplo, ser alogénicas con respecto a las células diana endoteliales y las células efectoras. La proporción de células diana endoteliales y células progenitoras CD34-negativo puede ser, por ejemplo, 5:1. La proporción de células efectoras a células diana endoteliales puede ser, por ejemplo, 20:1, 10:1 o 5:1. Una muestra de referencia (22') se preparó combinando una segunda parte de las células diana etiquetadas (20') y una segunda parte de las células efectoras (16') sin células progenitoras CD34-negativo, en la misma proporción que en la muestra.

35

40 La incubación de la muestra y de la muestra de referencia se mantienen (23, 23'). La incubación puede, por ejemplo, mantenerse durante aproximadamente cuatro horas.

Tras esto, se determina la cantidad de células diana endoteliales lisadas en la muestra y en la muestra de referencia (24, 24'). Con este fin, las células diana endoteliales lisadas pueden etiquetarse con una segunda etiqueta que representa las células diana lisadas distinguibles de las células diana no lisadas. Dicha segunda etiqueta puede, por ejemplo, ser una tinción adecuada para tincar células muertas de forma positiva. Por ejemplo, puede utilizarse una tinción fluorocromática como la bromodesoxiuridina. Un procedimiento adecuado para determinar la cantidad de células diana endoteliales lisadas puede ser, por ejemplo, una citometría de flujo. Por ejemplo, el porcentaje de células lisadas puede determinarse determinando la cantidad de células que llevan la primera y la segunda etiqueta, por ejemplo DIOC18<sub>3</sub> y PI, dentro de la población total de células que portan la primera etiqueta, por ejemplo, DIOC18<sub>3</sub>, mediante citometría de flujo.

45

50

Además, el porcentaje de células diana específicamente lisadas por las células efectoras puede corregirse sustrayendo el porcentaje de células lisadas aleatoriamente. Con este fin, una tercera parte (25) de las células diana etiquetadas (19) se prepara, la cual contiene células efectoras ni células progenitoras CD34-negativo. La tercera parte se trata adicionalmente (25) de la misma forma que la muestra y la muestra de referencia, tras lo cual la cantidad de células diana endoteliales lisadas aleatoriamente en la tercera parte (26) se determina como se ha descrito anteriormente.

55

60 **EJEMPLO 2: Las células progenitoras CD34-negativo externas de la presente invención protegen las células**

**de la lisis mediante CTL CD8+ alogénico**

El ensayo de citotoxicidad descrito en el ejemplo 1 se utilizó para evaluar la lisis de las células diana endoteliales (HMEC) mediante Linfocitos T citotóxicos alogénicos con y sin células progenitoras CD34-negativo derivadas externamente de la presente invención. En este caso, se utilizaron células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo aisladas de la médula ósea. Las BM-CMM se aumentaron en el medio Bio-1 lo que resultó en poblaciones de células favorables para el uso terapéutico en términos de mantener las características de la célula madre, la viabilidad de la célula y la potencia a la hora de proteger el endotelio vascular de las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente.

Se prepararon diferentes proporciones de células efectoras y células diana de 20:1, 10:1 y 5:1. Para cada proporción, se prepararon seis muestras individuales sin CMM de médula ósea y seis muestras individuales con CMM de médula ósea (BM-CMM). En este último caso, las células diana se incubaron con las BM-CMM de un único donante durante 24 horas antes de la adición de células efectoras.

Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 2. El gráfico muestra la lisis específica de las células diana en un porcentaje por encima de la proporción de célula efectora a diana respectiva para las muestras sin la BM-CMM (marcadores con forma de diamante) y con la BM-CMM (marcadores cuadrados). Los datos representan los valores medios y la desviación estándar de seis experimentos individuales. Se observó que la BM-CMM inhibe la lisis de las células endoteliales alogénicas mediante CTL CD8+ con una alta significancia en todas las proporciones E/T probadas (\*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0,001$ ). De media, la lisis específicas de las células diana endoteliales alogénicas se redujo en aproximadamente un 65%, es decir desde  $28,3 \pm 5,8\%$  hasta  $9,7 \pm 8,3\%$ , mediante la adición de células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo de médula ósea.

**EJEMPLO 3: La acción inmunomodulatoria de las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención es específica del endotelio.**

Como control, se realizó un experimento como se ha descrito en el ejemplo 2, con la diferencia de que las BM-CMM CD34-negativo no se añadieron a las células endoteliales, sino que se pre-incubaron con las células efectoras y luego se eliminaron. En este caso, no se observó ninguna reducción en la lisis específica de las células diana endoteliales cuando las células efectoras se pre-incubaron con las BM-CMM en comparación con las células efectoras que no se pre-incubaron con las BM-CMM. Puede por tanto concluirse que la actividad inmunomodulatoria de las BM-CMM está relacionada con una interacción específica de las BM-CMM con las células diana endoteliales.

**EJEMPLO 4: La lisis de la célula diana endotelial por CTL CD8+ alogénico es clase I MHC restringida e independiente de la célula asesina natural de la actividad de la célula asesina activada por linfoquina.**

Como un control adicional, se investigó si la actividad lítica de las células efectoras de linfocito T citotóxicas CD8+ alogénicas es específica del antígeno al estar restringidas a la presentación clase I MHC de los aloantígenos. Con este fin, las células diana endoteliales se sometieron a células efectoras CD8+ como en el ejemplo 2, pero en la presencia de un anticuerpo de clase I MHC neutralizador (W6/32). Además, se observó que las células efectoras no poseen una actividad que se corresponde a la de las células asesinas naturales o las células asesinas activadas por linfoquina no especificadas. Este control se consiguió realizando un experimento como en el ejemplo 2, pero donde las células diana endoteliales se sustituyeron por una línea de células diana de control para las células asesinas naturales (K562).

Los resultados de estos experimentos de control se resumen en la Figura 3. Las columnas representan el promedio aritmético y la desviación estándar de la lisis específica de las células diana en una proporción efectora/diana de 20 de cuatro experimentos independientes, cada uno con cuatro donantes individuales de BM-CMM. Los resultados muestran que la presencia de un anticuerpo de clase I anti-MHC neutralizador reduce significativamente la lisis específica de las células diana (\*, \*\*:  $p < 0,001$ ), lo que confirma que la actividad lítica de las células efectoras es específica del aloantígeno. Además, la lisis de las dianas de control K562 se redujo significativamente (\*\*\*:  $p < 0,002$ ), demostrando que las células efectoras Linfocito T citotóxicas no poseen una actividad correspondiente con la de las células asesinas naturales o las células asesinas activadas por linfoquina.

**EJEMPLO 5: La protección de las células diana endoteliales contra la lisis por las células efectoras CTL CD8+ es específica a las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención.**

Las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención como las células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo derivadas de la médula ósea son células relativamente grandes. Por tanto, se

debería evaluar si la protección de las células diana endoteliales por BM-CMM se basaba en una inhibición estérica de las células efectoras linfocito-T CD8+ para acceder a las células endoteliales por las BM-CMM en vez de en la capacidad inmunomodulatoria de las BM-CMM. El diseño experimental era análogo al ejemplo 2, pero donde se añadieron células de tipo fibroblasto del tejido coronario humano a las células diana endoteliales en vez de BM-CMM. Las células de tipo fibroblasto se hicieron coincidir el tamaño con las BM-CMM.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Las columnas representan el promedio aritmético y la desviación estándar de la lisis específica de las células diana endoteliales, normalizados en porcentaje con la lisis de las células endoteliales sin protección, de tres experimentos diferentes con tres donantes de BM-CMM diferentes. No se observó un efecto protector para las células diana endoteliales por la adición de las células de control que coincidían en tamaño (\*\*: no significancia), lo que demostraba que la protección de las células diana endoteliales por BM-CMM está inmunológicamente relacionada y no se debía a la inhibición estérica.

**EJEMPLO 6: Las células madre CD34-negativo de la presente invención no han estado inmunológicamente comprometidas.**

Es importante que las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención no sean inmunogénicas. Por este motivo, se investigó la inmunogenicidad de las células madre/estromales mesenquimales CD34-negativo. El experimento se realizó igual que el ejemplo 2, pero donde no se utilizaron células endoteliales sino células madre/estromales mesenquimales de médula ósea como las células diana en ausencia de las células endoteliales. No se observó ninguna actividad lítica de las células efectoras linfocitos T citotóxicos CD8+ cuando las BM-CMM se presentaron como dianas. Esta conclusión está en consonancia con la falta de exposición inmunológica de las células progenitoras CD34-negativo y las células madre/estromales mesenquimales en particular.

**Ejemplo 7: Capacidad de protección endotelial de las células progenitoras CD34- de la presente invención a partir de diferentes orígenes**

Se comparó la efectividad de las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención derivada de los tejidos de diferentes orígenes a la hora de proteger las células diana endoteliales contra la lisis mediada por CTL CD8+. Se realizaron experimentos como en el Ejemplo 2, donde las células progenitoras CD34<sup>+</sup> (21 eran CMM (BM-CMM), 9 muestras individuales), CMM derivadas del cordón umbilical (UC-CMM, 4 muestras individuales), o CMM derivadas de la amnios (AMC-CMM, 3 muestras individuales). Los resultados de estos experimentos de control se resumen en la Figura 5. Cada par de columnas muestra el promedio aritmético y la desviación estándar de la lisis de la célula diana endotelial específica en porcentaje sin protección CMM (columnas sólidas) y con protección CMM (columnas sombreadas) en dependencia del origen de la CMM. Todas las CMM probadas pudieron proteger las células diana endoteliales de la lisis mediada por CTL CD8+. La protección más potente se observó con las BM-CMM, donde la lisis de la célula endotelial se redujo de media en un 72,3% en comparación con el control sin protección CMM. Las AMC-CMM redujeron la lisis de la célula endotelial de media en un 53,2% aproximadamente, y las UC-CMM redujeron la lisis de la célula endotelial de media en un 39,5% aproximadamente. Este ejemplo también destaca la importancia del presente procedimiento para determinar la capacidad de las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente para evaluar la potencia de protección de las células de diferentes orígenes, y para predecir de forma positiva el efecto de las células progenitoras CD34-negativo de la presente invención *in vivo*.

## REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales CD34-negativo humanas para su uso en el tratamiento o protección del endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas por el Linfocito T citotóxico CD8+ de un sujeto en riesgo de, o aquejado de, una enfermedad inflamatoria vascular.
2. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso en el tratamiento médico de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el tratamiento comprende la administración de células progenitoras CD34-negativo y dichas células progenitoras CD34-negativo consisten en células madre mesenquimales CD34-negativo.
3. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, donde las células madre mesenquimales CD34-negativo se administran como una mezcla que comprende un portador farmacéuticamente aceptable, donde dicha mezcla comprende células progenitoras CD34-negativo y dichas células progenitoras CD34-negativo consisten en células madre mesenquimales CD34-negativo.
4. Células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas por el Linfocito T citotóxico CD8+ para la prevención de la enfermedad inflamatoria vascular en un sujeto en riesgo de desarrollar complicaciones endoteliales post-trasplante.
5. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los linfocitos T citotóxicos CD8+ comprenden linfocitos T citotóxicos específicos del endotelio que son CD27- y CD28-negativo.
6. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enfermedad inflamatoria vascular comprende una reacción contra el endotelio vascular de un trasplante de órgano sólido que es alogénico con respecto al sujeto, y/o una vasculitis aguda, inflamatoria o alérgica como resultado de una respuesta autoinmune y/o una inflamación crónica del endotelio vascular.
7. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la enfermedad inflamatoria vascular comprende las complicaciones relacionadas con el trasplante tras el trasplante de una célula madre hematopoyética alogénica, donde las complicaciones relacionadas con el trasplante comprenden preferiblemente la enfermedad injerto contra huésped (EICH) y/o una enfermedad microangiopática.
8. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la vasculitis aguda, inflamatoria o alérgica comprende la granulomatosis alérgica, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, arteritis Takayasu, enfermedad de Kawasaki, tromboangiitis obliterante (enfermedad de Buerger), poliarteritis nodosa, síndrome de Churg-Strauss, poliangiitis urticarial, enfermedad de Behçet, síndrome de Goodpasture, vasculitis post-infecciosa, o vasculitis inducida por medicamentos..
9. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células madre mesenquimales CD34-negativo se seleccionan de un grupo que células madre mesenquimales CD34-negativo de médula ósea, cordón umbilical, placenta o tejido adiposo, o combinaciones de los mismos.
10. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células madre mesenquimales CD34-negativo se **caracterizan por** la expresión de CD105, CD73 y CD90, y la falta de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19.
11. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las células madre mesenquimales CD34-negativo se utilizan en combinación con al menos otro componente farmacológicamente activo.
12. Las células madre mesenquimales CD34-negativo para su uso de acuerdo con la reivindicación anterior, donde el al menos otro componente farmacológicamente activo tiene una actividad farmacológica seleccionada del grupo que comprende actividad anti inflamatoria, actividad anti-isquémica, actividad anti-trombótica y combinaciones de las mismas.

13. Un procedimiento in vitro para determinar la capacidad de las células madre mesenquimales CD34-negativo para proteger el endotelio vascular contra las reacciones citotóxicas mediadas inmunológicamente de sujetos en riesgo de, o aquejados con enfermedad inflamatoria vascular en una muestra que comprende células diana endoteliales, Linfocitos T citotóxicos CD8+ y células madre mesenquimales CD34-negativo y una muestra de referencia que comprende células diana endoteliales y Linfocitos T citotóxicos CD8+ sin células madre mesenquimales CD34-negativo, y comparar la lisis de las células diana endoteliales en la muestra y en la muestra de referencia.
- 10 14. El procedimiento de la reivindicación 13, donde los Linfocitos T CD8+ son co-cultivados con células endoteliales alogénicas en la presencia de Interleucina-2 antes de preparar la muestra y la muestra de referencia con las células diana endoteliales y dichos Linfocitos T CD8+.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14 donde se añade al menos otro componente farmacológicamente activo a la muestra y/o a la muestra de referencia.

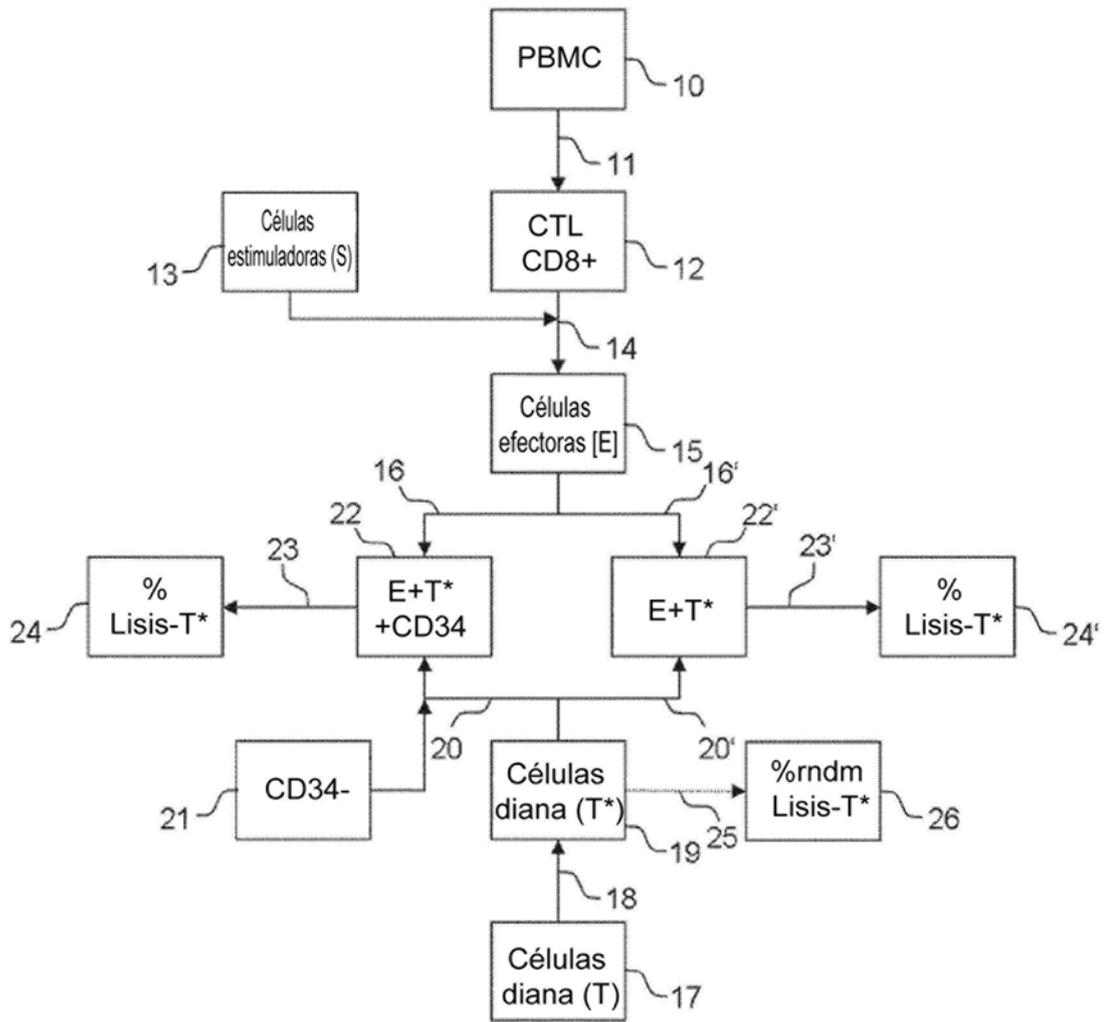


Figura 1

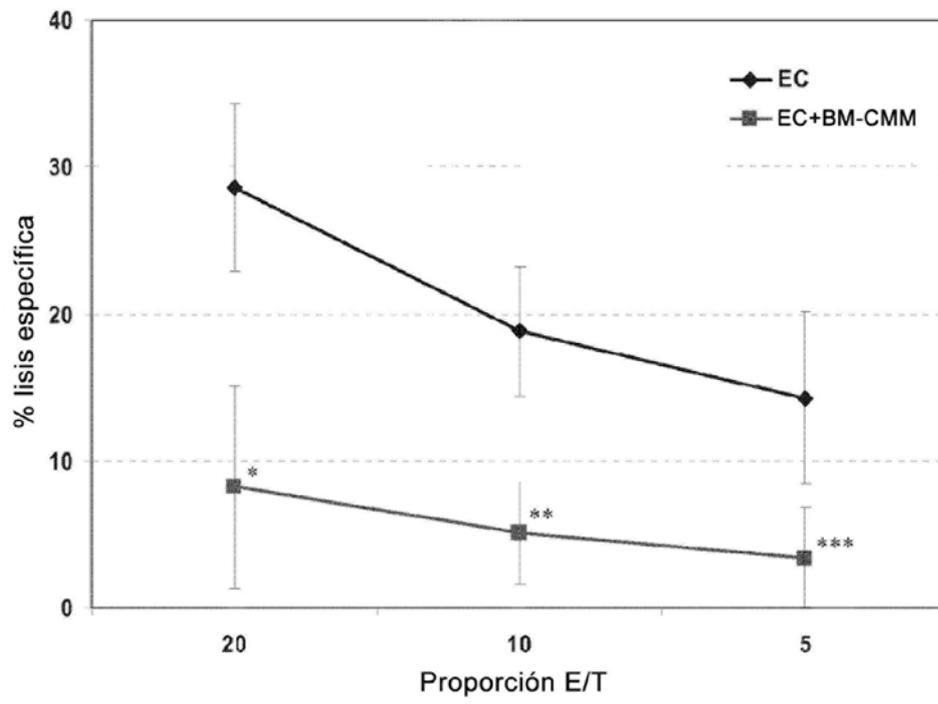


Figura 2

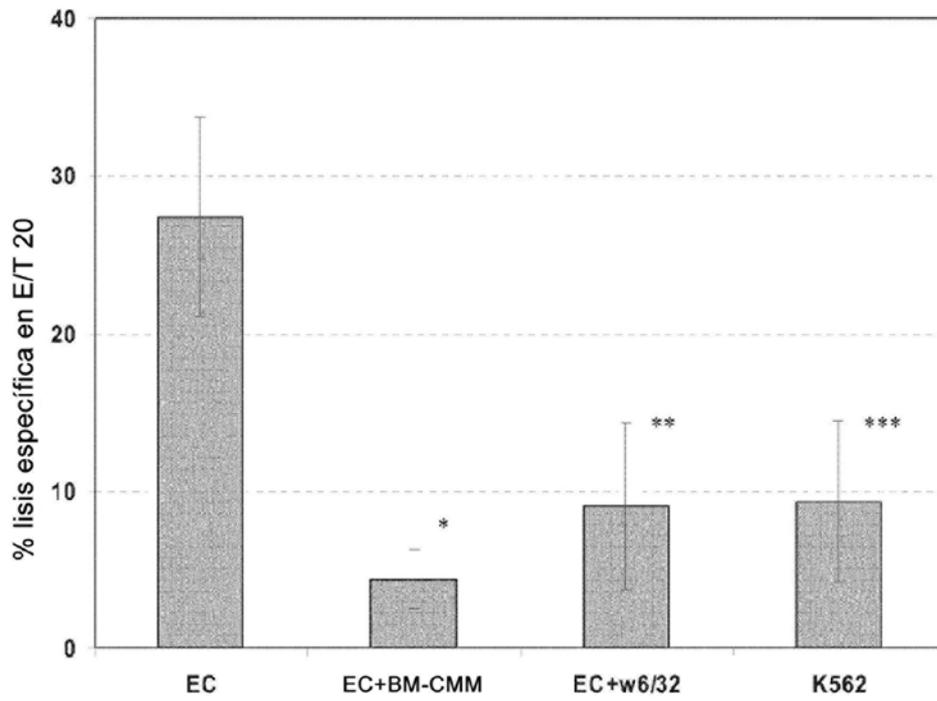


Figura 3

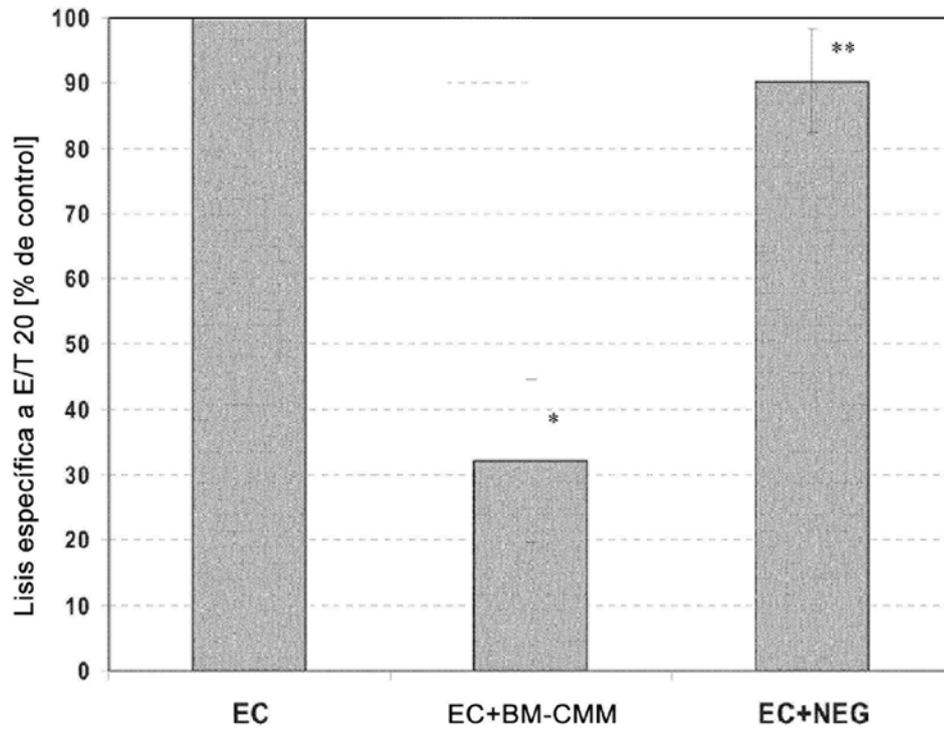


Figura 4

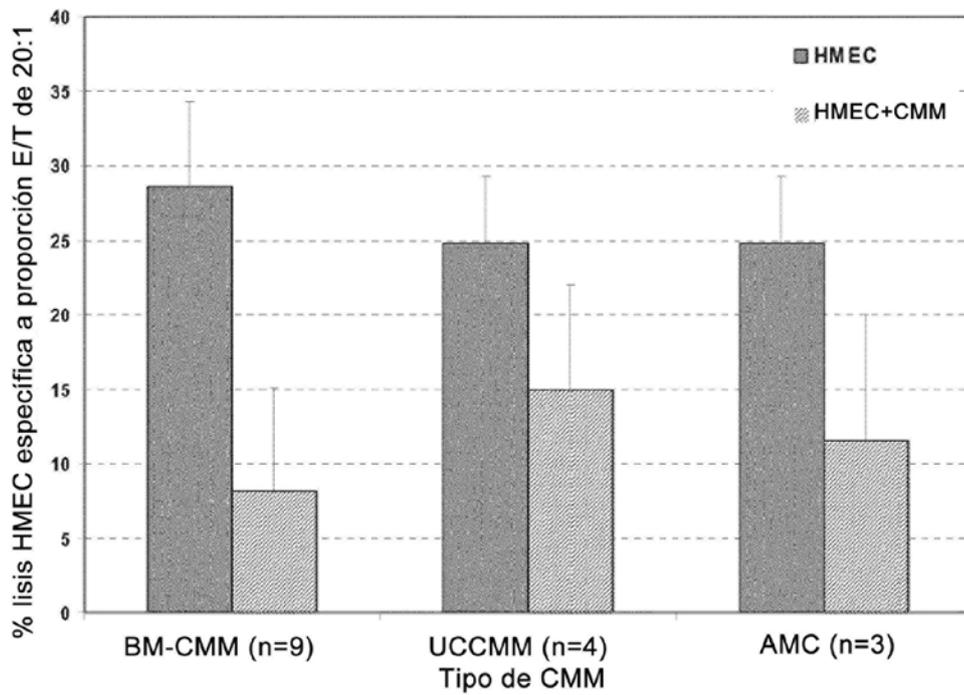


Figura 5