

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 337**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**A61K 35/32** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2009 PCT/EP2009/055559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09135914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2009 E 09742132 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2297304**

54 Título: **Células de formación de hueso humanas en el tratamiento de enfermedades y estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión**

30 Prioridad:

**07.05.2008 EP 08155768**

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

**11.01.2018**

73 Titular/es:

**BONE THERAPEUTICS S.A. (100.0%)  
Rue Auguste Piccard 37  
6041 Gosselies, BE**

72 Inventor/es:

**ALBARANI, VALENTINA;  
BASTIANELLI, ENRICO;  
BADOER, CINDY y  
PESESSE, XAVIER**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

**ES 2 649 337 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

Células de formación de hueso humanas en el tratamiento de enfermedades y estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión

### Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a aplicaciones terapéuticas de células de formación de hueso en el tratamiento de enfermedades y estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión.

### Antecedentes de la invención

- 10 Los trastornos por inmunodeficiencia representan un grupo diverso de estados graves en los que la función comprometida del sistema inmunitario provoca un aumento de la susceptibilidad de los pacientes a diversas infecciones o estados oportunistas.

La inmunodeficiencia también puede resultar de la administración de inmunosupresores (por ejemplo, para prevenir el rechazo de órganos trasplantados) o como efecto secundario de tratamientos dirigidos a otras patologías, tales como, por ejemplo, quimioterapia.

Existe la necesidad de modalidades de tratamiento adicionales en los trastornos por inmunodeficiencia.

- 15 Las células madre mesenquimatosas (MSC) humanas expresan altos niveles de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y no expresan HLA de clase II pero pueden inducirse para que expresen este último mediante estimulación con interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Le Blanc *et al.* 2003. Exp Hematol 31: 890-6).

- 20 Se ha notificado que MSC también podrían actuar como células presentadoras de antígeno. Se observó esta función en una ventana de tiempo estrecha y sólo después de la administración de y/o estimulación con IFN $\gamma$ , pero no en MSC no estimuladas. En presencia de antígeno específico (de *Candida albicans* o toxoide tetánico), las células MSC pueden regular por incremento la expresión del antígeno HLA de clase II antígeno mediante secreción autocrina de bajos niveles de IFN $\gamma$ . Sin embargo, cuando aumenta la concentración de IFN $\gamma$  en cultivo, se regula por disminución la expresión de HLA de clase II y se inhibe la función APC de MSC (Stagg *et al.* 2006. Blood 107: 2570-7; Chan *et al.* 2006. Blood 107: 4817-24).

- 25 Los osteoblastos de hueso trabecular o de líneas celulares han mostrado que son inmunocompetentes y que estimulan células mononucleares de sangre periférica alogénicas (Skjodt *et al.* 1989. Immunology 68: 416-20).

El documento WO 2007/093431 se refiere a un método para la diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea (BMSC) y a usos de las mismas.

- 30 Kim Seok-Jung *et al.* (Journal of Medical Case Reports 2008, vol. 2, 58) se refiere a un caso clínico del tratamiento de osteonecrosis de la cabeza femoral usando osteoblastos en cultivo autólogos.

Gangji *et al.* (Bone, 2007, vol. 40, S47) se refiere a un caso clínico del tratamiento de osteonecrosis de la cabeza femoral con implantación de células preosteoblásticas autólogas en la zona necrótica.

### Descripción de la invención

- 35 A menos que se definan de otro modo, todos los términos usados en la divulgación de la invención, incluyendo los términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular “un(o)”, “una” y “el/la” incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A modo de ejemplo, “una célula” se refiere a una o más de una célula.

- 40 Los términos “que comprende”, “comprende” y “que se compone de” tal como se usan en el presente documento son sinónimos de “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son incluyentes o abiertos y no excluyen miembros elementos o etapas de método adicionales, no citados.

La cita de intervalos numéricos por sus límites incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de ese intervalo, así como los límites citados.

- 45 El término “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende englobar variaciones de +/- 10% o menos, preferiblemente +/- 5% o menos, más preferiblemente +/- 1% o menos, y todavía más preferiblemente +/- 0,1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas para actuar en la invención dada a conocer. Ha de entenderse que el valor al que se refiere el modificador “aproximadamente”  
50 también se da a conocer por sí mismo específicamente y de manera preferible.

Todos los documentos citados en la presente memoria descriptiva se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. En particular, se incorporan como referencia las enseñanzas de todos los documentos a los que se hace referencia específicamente en el presente documento.

5 Los presentes inventores se dieron cuenta con sorpresa de que las células de formación de hueso presentan potentes propiedades de células presentadoras de antígeno (APC), además de las acciones osteorregenerativas esperadas y, por tanto, son útiles en el tratamiento de enfermedades y estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión.

10 Ventajosamente, los inventores también hallaron que las células de formación de hueso, tales como en particular células de formación de hueso que pueden obtenerse *in vitro* mediante diferenciación a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) o células del estroma de la médula ósea (BMSC) aisladas, pueden presentar marcadores inmunológicos distintivos (tales como, por ejemplo, antígeno HLA de clase II) y propiedades de células presentadoras de antígeno de manera sustancialmente independiente de la activación o estimulación (tal como, por ejemplo, mediante interferón gamma). Por tanto, dichos marcadores y propiedades de APC no se limitan necesariamente a una ventana de tiempo estrecha tras una activación o estimulación. Tales propiedades de APC comparativamente estacionarias hacen que las células de formación de hueso sean un agente ventajoso en el tratamiento de las enfermedades y los estados anteriores.

Por consiguiente, la presente invención proporciona contenido según se expone en todos y cada uno de (i) a (vii) a continuación:

20 (i) Células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, en las que dichas células de formación de hueso son osteoblastos u osteocitos y en las que las células de formación de hueso comprenden la expresión de HLA-II, y en las que dicha enfermedad o dicho estado óseo asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión es osteoporosis, osteopenia, fragilidad ósea, necrosis ósea, fractura ósea, microfracturas óseas u osteólisis de hueso.

25 (ii) Células de formación de hueso aisladas para su uso tal como se expuso en (i) anteriormente, en las que las células de formación de hueso presentan las siguientes características:

a) las células comprenden la expresión de fosfatasa alcalina (ALP);

b) las células comprenden la expresión de uno cualquiera o más de propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), osteonectina (ON), osteopontina (OP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP);

30 c) las células muestran evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio;

d) las células comprenden la expresión de HLA-I y HLA-II.

(iii) Células de formación de hueso aisladas para su uso tal como se expuso en (i) o (ii) anteriormente, en las que dichas células de formación de hueso pueden obtenerse mediante diferenciación a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) o células del estroma de la médula ósea (BMSC).

35 (iv) Células de formación de hueso aisladas para su uso tal como se expuso en uno cualquiera de (i) a (iii) anteriormente, en las que dichas células de formación de hueso muestran evidencias de propiedades de presentación de antígeno.

40 (v) Células de formación de hueso aisladas para su uso tal como se expuso en uno cualquiera de (i) a (iv) anteriormente, en las que las células de formación de hueso son de origen humano y el medicamento va a emplearse para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos.

45 (vi) Una composición farmacéutica que comprende células de formación de hueso que comprenden la expresión de HLA-II y una citocina proinflamatoria, para el uso simultáneo, secuencial o independiente en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, en las que dicha enfermedad o dicho estado óseo asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión es osteoporosis, osteopenia, fragilidad ósea, necrosis ósea, fractura ósea, microfracturas óseas u osteólisis de hueso.

(vii) La composición farmacéutica para su uso tal como se expuso en (vi) anteriormente, en las que la citocina proinflamatoria es  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 o IL-18.

Por tanto, el contenido proporcionado por la invención pertenece específicamente a la divulgación, descripción y enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

50 La memoria descriptiva describe además:

- células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión;

- el uso de células de formación de hueso aisladas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión;
- un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células de formación de hueso aisladas;
- una composición farmacéutica que comprende células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión.

El término “aislar” con referencia a un componente particular indica separar ese componente de al menos otro componente de una composición de la que el primer componente se “aisla” de ese modo. El término “aislado” tal como se usa en el presente documento en relación con células o poblaciones celulares también implica que tales células o poblaciones celulares no forman parte del cuerpo de un animal o ser humano, sino que se retiran o separan del mismo, tal como, por ejemplo, se mantienen y/o propagan en cultivo celular.

Las células de formación de hueso pueden ser preferiblemente de origen animal, más preferiblemente de origen de mamífero incluyendo origen de mamífero no humano e incluso más preferiblemente de origen humano.

Las células de formación de hueso pueden obtenerse habitualmente a partir de o derivarse de una muestra biológica de un sujeto (es decir, una muestra retirada de un sujeto y que comprende células del mismo) tal como preferiblemente un sujeto humano o mamífero no humano.

Las células de formación de hueso pueden emplearse preferiblemente para la administración autóloga (es decir, administrarse al mismo sujeto del que se han obtenido o derivado las células) o administración alogénica (es decir, administrarse a un sujeto distinto a, pero de la misma especie que, el sujeto del que se han obtenido o derivado las células. También puede ser posible la administración xenogénica de dichas células de formación de hueso (es decir, en las que se administran células obtenidas o derivadas de un sujeto de una especie a un sujeto de una especie diferente).

Preferiblemente en el presente documento, las células de formación de hueso humanas van a emplearse para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos que tienen una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión.

El término “células de formación de hueso” tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a células que pueden contribuir a la formación de material óseo y/o matriz ósea, y particularmente indica células o poblaciones celulares aisladas que han progresado parcial o completamente a lo largo de la ruta de diferenciación osteogénica. Sin limitación, las células de formación de hueso engloban particularmente células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y otros tipos de célula del linaje osteogénico tal como se conoce en la técnica.

Por tanto, un experto aprecia generalmente los límites del término “células de formación de hueso” tal como se pretende en el presente documento. No obstante, a modo de orientación adicional y no de limitación, las presentes células de formación de hueso pueden presentar una cualquiera, más o todas de las siguientes características:

a) las células comprenden la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), más específicamente ALP de tipo de hígado-riñón;

b) las células comprenden la expresión de uno cualquiera o más o la totalidad de propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), osteonectina (ON), osteopontina (OP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP);

c) las células muestran evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio (por ejemplo, cuando se exponen a medio osteogénico; véase Jaiswal *et al.* 1997. *J Cell Biochem* 64: 295-312). La acumulación de calcio en el interior de las células y la deposición en proteínas de la matriz puede medirse de manera convencional, por ejemplo mediante cultivo en  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , lavado y nuevo cultivo, y determinando luego cualquier cantidad de radiactividad presente en el interior de la célula o depositada en la matriz extracelular (documento US 5.972.703), o usando un ensayo de mineralización basado en rojo de alizarina (véase, por ejemplo, Gregory *et al.* 2004. *Analytical Biochemistry* 329: 77-84);

d) las células no se diferencian sustancialmente hacia una cualquiera de, y preferiblemente hacia ninguna de las células del linaje adipocítico (por ejemplo, adipocitos) o linaje condrocítico (por ejemplo, condrocitos). La ausencia de diferenciación hacia tales linajes celulares puede someterse a prueba usando condiciones de inducción de diferenciación convencionales establecidas en la técnica (por ejemplo, véase Pittenger *et al.* 1999. *Science* 284: 143-7), y métodos de ensayo (por ejemplo, cuando se inducen, los adipocitos se tiñen normalmente con rojo al aceite O mostrando acumulación de lípidos; los condrocitos se tiñen normalmente con azul alciano o safranina O). Carecer sustancialmente de propensión a la diferenciación adipogénica y/o condrogénica puede significar normalmente que menos del 50%, o menos del 30%, o menos del 5%, o menos del 1% de las células sometidas a prueba mostrarán signos de diferenciación adipogénica o condrogénica cuando se aplican a la prueba respectiva.

En una realización, las células de formación de hueso pueden presentar todas las características enumeradas en a), c) y d) anteriormente.

En una realización, las células de formación de hueso son positivas para (es decir, comprenden la expresión de) antígenos HLA de clase II.

- 5 En una realización, las células de formación de hueso son positivas para (es decir, comprenden la expresión de) antígenos HLA de clase I y HLA de clase II.

En una realización adicional, las células de formación de hueso muestran evidencias de propiedades de células presentadoras de antígeno (APC).

- 10 En otra realización, las células de formación de hueso pueden mostrar evidencias de propiedades inmunosupresoras.

15 Cuando se dice que una célula es positiva para un componente particular (por ejemplo, marcador o enzima), esto significa que un experto concluirá la presencia o evidencias de una señal diferenciada, por ejemplo, detectable por anticuerpo o detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, para ese componente cuando se lleva a cabo la medición apropiada, en comparación con controles adecuados. Cuando el método permite la evaluación cuantitativa del componente, las células positivas pueden generar, en promedio, una señal que es significativamente diferente del control, por ejemplo, pero sin limitación, al menos 1,5 veces mayor que tal señal generada por células de control, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 4 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces mayor o incluso mayor.

20 La expresión de los marcadores específicos de célula anteriores puede detectarse usando cualquier técnica inmunológica adecuada conocida en la técnica, tal como inmunocitoquímica o adsorción por afinidad, análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western, FACS, ELISA, etc., o mediante cualquier ensayo bioquímico adecuado de la actividad enzimática (por ejemplo, para ALP), o mediante cualquier técnica adecuada de medición de la cantidad del ARNm del marcador, por ejemplo, transferencia de tipo Northern, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, etc. Se conocen los datos de secuencia para los marcadores enumerados en esta divulgación y pueden obtenerse de bases de datos públicas tales como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

25 Pueden obtenerse o derivarse células de formación de hueso aisladas o poblaciones celulares para su uso en la invención o tal como se describe en el presente documento de cualquiera manera adecuada conocida en la técnica. Sin limitación, se ha dado a conocer un método adecuado para obtener osteoblastos de formación de hueso, más particularmente osteoblastos y poblaciones de osteoblastos positivos para HLA de clase II, en el documento WO 2007/093431 e implica cultivar células del estroma de la médula ósea (BMSC) o células madre mesenquimatosas (MSC) aisladas en presencia de suero o plasma y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2). En otro ejemplo, pueden aislarse directamente osteoblastos de formación de hueso, más particularmente osteoblastos positivos para HLA de clase II, y cultivarse a partir de hueso trabecular tal como se describe por Skjodt *et al.* 1985 (J Endocrinol 105: 391-6). En aún un ejemplo adicional, pueden obtenerse células del linaje osteogénico mediante la diferenciación de MSC en medio osteogénico tal como se describe por Pittenger *et al.* 1999 (Science 284: 143-7) y Jaiswal *et al.* 1997 (supra), preferiblemente en presencia de FGF-2 para conseguir osteoblastos y poblaciones de osteoblastos positivos para HLA de clase II.

30 En una realización preferida, las células de formación de hueso aisladas para usos tal como se define en el presente documento, pueden obtenerse u obtenerse directamente mediante diferenciación a partir de BMSC o MSC. Ventajosamente, tal diferenciación puede comprender exponer las BMSC o MSC a FGF-2 para conseguir osteoblastos y poblaciones de osteoblastos positivos para HLA de clase II. Estas células presentan propiedades de APC comparativamente estables que pueden obtenerse sin factores de activación externos.

35 El término "inmunodeficiencia" indica generalmente un estado en el que la función del sistema inmunitario específica y/o no específica de un sujeto está ausente o reducida de manera patológica. Enfermedades o estados asociados con inmunodeficiencia o "trastornos por inmunodeficiencia" se refieren a un grupo diverso de estados caracterizados principalmente por un aumento de la susceptibilidad a diversas infecciones oportunistas con la consiguiente enfermedad grave aguda, recurrente o crónica, que resulta de inmunodeficiencia debida a uno o más defectos en el sistema inmunitario. Los trastornos por inmunodeficiencia engloban, sin limitación, "síndromes de inmunodeficiencia" en los que todas las características son el resultado del defecto inmunitario, y "síndromes con inmunodeficiencia", en los que algunas características incluso primordiales no pueden explicarse por el defecto inmunitario.

40 El grupo de trastornos por inmunodeficiencia también engloba enfermedades y estados asociados con inmunosupresión, en los que este último término se refiere a la disminución o prevención artificial, habitualmente controlada de la respuesta inmunitaria de un sujeto. La inmunosupresión en sujetos puede estar provocada por inmunosupresores ("inmunosupresor" se refiere a cualquier compuesto o agente que se sabe o se halla que suprime o previene una respuesta inmunitaria no deseada, tal como, por ejemplo, prevenir el rechazo por el sistema inmunitario de un órgano trasplantado; los ejemplos de inmunosupresores incluyen, sin limitación, ciclosporina A, micofenolato mofetilo, rapamicina, FK506 y corticosteroides), o puede producirse como efecto secundario de una terapia de otras indicaciones (por ejemplo, efecto secundario de quimioterapia para el cáncer).

- A modo de ejemplo y no de limitación, las enfermedades y los estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión comprenden: infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hipogammaglobulinemia, cánceres hematológicos tales como leucemia y linfoma, ablación total de la médula ósea, trasplante de médula ósea, trasplante de órganos, linfocitopenia (linfopenia) de cualquier origen, lupus eritematoso, caquexia, consumo excesivo de opioides, mastocitosis, fiebre reumática, tripanosomiasis, consumo excesivo de alcohol; y tratamientos con: agentes quimioterápicos, corticosteroides, fármacos anti-TNF, radiación, fármacos inmunosupresores tales como entre otros tacrolimús, ciclosporina, metotrexato, micofenolato, azatioprina, interferones e inmunoglobulinas tales los anticuerpos anti-CD 20 y anti-CD3.
- 5
- 10 En una realización, las enfermedades o los estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión también pueden incluir una componente de disfunción ósea o de lesión ósea (tal como, por ejemplo, osteoporosis, osteonecrosis, osteopenia, fragilidad ósea, necrosis ósea, fractura ósea (o microfracturas), esclerosis ósea y osteólisis de hueso). Ventajosamente, las células de formación de hueso de la invención pueden actuar sinérgicamente sobre tales enfermedades mejorando la inmunodeficiencia y estimulando la reconstrucción ósea.
- 15 Así, la memoria descriptiva también describe:
- células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión;
  - el uso de células de formación de hueso aisladas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión;
- 20 - un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células de formación de hueso aisladas;
- una composición farmacéutica que comprende células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión.
- 25 Preferiblemente, las células de formación de hueso humanas pueden emplearse para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos que tienen una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión.
- Las células de formación de hueso aisladas pueden administrarse a sujetos, para tratar enfermedades o estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión, incluyendo enfermedades o estados óseos asociados con
- 30 inmunodeficiencia o inmunosupresión, tal como se definió anteriormente.
- Opcionalmente, para estimular las propiedades de APC de las células de formación de hueso, las células pueden tratarse con una citocina proinflamatoria antes de la administración, o alternativamente, pueden administrarse conjuntamente con (por ejemplo, simultánea o secuencialmente o por separado en cualquier orden) una citocina proinflamatoria. Los ejemplos de citocinas proinflamatorias incluyen, sin limitación,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-17$ ,  $IL-18$ .
- 35 Los términos "sujeto" o "paciente" se refieren preferiblemente a animales, más preferiblemente animales de sangre caliente, aún más preferiblemente vertebrados, e incluso más preferiblemente mamíferos, incluyendo específicamente seres humanos y mamíferos no humanos, que han sido objeto de tratamiento, observación o experimento. El término "mamífero" incluye cualquier animal clasificado como tal, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológicos, animales para deportes, animales
- 40 mascotas, animales de compañía y animales de experimentación, tales como, por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, conejos, perros, gatos, cobayas, ganado, vacas, ovejas, caballos, cerdos y primates, por ejemplo, monos y simios. Se prefieren particularmente sujetos humanos, incluyendo ambos sexos y todas las categorías de edad de los mismos.
- Los presentes tratamientos son particularmente para que se administren a sujetos que los necesitan, expresión que
- 45 incluye sujetos que se beneficiarán del tratamiento de un estado dado, tal como una enfermedad o un estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, incluyendo enfermedades o estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión. Tales sujetos pueden incluir, sin limitación, aquellos a los que se les ha diagnosticado dicho estado, aquellos propensos a desarrollar dicho estado y/o aquellos en los que va a prevenirse dicho estado.
- 50 Los términos "tratar" o "tratamiento" engloban tanto el tratamiento terapéutico de un trastorno ya desarrollado, tal como la terapia de una enfermedad o un estado ya desarrollado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, incluyendo una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, así como medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o reducir las probabilidades de incidencia de una afección no deseada, tal como prevenir las probabilidades de contracción y progresión de una enfermedad o un
- 55 estado asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, alivio de uno o más síntomas o uno o más marcadores biológicos, disminución de la extensión

de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y similares. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

- 5 El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que inhibe o retrasa en un sujeto la aparición de un trastorno tal como busca un investigador, veterinario, doctor u otro médico clínico. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o farmacéutica en un sujeto que busca un investigador, veterinario, doctor u otro médico clínico, que puede incluir entre otros el alivio de los síntomas de la enfermedad o el trastorno que esté tratándose. Se conocen métodos en la técnica para determinar dosis terapéutica y profilácticamente eficaces.

10 El tratamiento puede emplear células y poblaciones celulares de formación de hueso autólogas (es decir, células derivadas del sujeto que va a tratarse), alogénicas (es decir, derivadas de sujeto(s) distinto(s) del sujeto que va a tratarse, pero pertenecientes a la misma especie) o xenogénicas (es decir, células derivadas de sujeto(s) pertenecientes a la especie distinta a la del sujeto que va a tratarse) tal como se define en el presente documento.

15 Se prevén en particular tratamientos de sujetos humanos usando células o poblaciones celulares de formación de hueso autólogas o alogénicas humanas tal como se definen en el presente documento.

De manera adecuada, las células y poblaciones celulares de formación de hueso definidas en el presente documento pueden formularse en y administrarse como composiciones farmacéuticas.

- 20 Las composiciones farmacéuticas comprenderán normalmente las células o poblaciones celulares de formación de hueso como principio activo, y uno o más portadores/excipientes farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, "portador" o "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), solubilizantes, coloides, medios de dispersión, vehículos, cargas, agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina), proteínas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, agentes para conseguir un efecto de depósito, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes de control de la tonicidad, agentes de retraso de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la actividad de las células.

25 La naturaleza precisa del portador o excipiente u otro material dependerá de la vía de administración. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Para los principios generales en formulación farmacéutica, se remite al lector a *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn & W. Sheridan eds., Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

35 Tales composiciones farmacéuticas pueden contener componentes adicionales que garantizan la viabilidad de las células en las mismas. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un sistema de tampón adecuado (por ejemplo, sistema de tampón fosfato o carbonato) para conseguir el pH deseado, más habitualmente pH casi neutro, y pueden comprender sal suficiente para garantizar estados isoosmóticos para las células para prevenir el estrés osmótico. Por ejemplo, una disolución adecuada para estos fines puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer con lactato, tal como se conoce en la técnica. Además, la composición puede comprender una proteína transportadora, por ejemplo, albúmina, que puede aumentar la viabilidad de las células.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender componentes adicionales útiles en la reparación de heridas y defectos óseos. Por ejemplo, tales componentes pueden incluir, sin limitación, proteínas morfogenéticas óseas, matriz ósea (por ejemplo, matriz ósea producida *in vitro* por células de la invención o mediante otros métodos), partículas de hidroxiapatita/fosfato de tricalcio (HA/TCP), gelatina, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-glicólico), ácido hialurónico, quitosano, poli-L-lisina y colágeno. Por ejemplo, las células osteoblásticas pueden combinarse con matriz ósea desmineralizada (DBM) u otras matrices para hacer que el material compuesto sea osteogénico (con formación de hueso por cuenta propia) así como osteoinductor. Métodos similares que usan células de médula ósea autólogas con DBM alogénica han producido buenos resultados (Connolly *et al.* 1995. *Clin Orthop* 313: 8-18).

45 La composición farmacéutica puede incluir además o coadministrarse con un factor bioactivo complementario tal como una proteína morfogenética ósea, tal como BMP-2, BMP-7 o BMP-4, o cualquier otro factor de crecimiento. Otros posibles componentes acompañantes incluyen fuentes inorgánicas de calcio o fosfato adecuadas para ayudar a la regeneración ósea (documento WO 00/07639). Si se desea, puede administrarse una preparación de células sobre una matriz o material portador para proporcionar una regeneración de tejido mejorada. Por ejemplo, el material puede ser una cerámica granular, o un biopolímero tal como gelatina, colágeno, osteonectina, fibrinógeno u

osteocalcina. Pueden sintetizarse matrices porosas según técnicas convencionales (por ejemplo, Mikos *et al.*, *Biomaterials* 14: 323, 1993; Mikos *et al.*, *Polymer* 35:1068, 1994; Cook *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 35:513, 1997).

5 Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además o coadministrarse en combinación con cualquier citocina proinflamatoria, que puede potenciar las propiedades de APC de las células de formación de hueso. Así, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende células de formación de hueso y una citocina proinflamatoria para el uso simultáneo, secuencial o independiente en el tratamiento de enfermedades y estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión, incluyendo enfermedades o estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión. Los ejemplos de citocinas proinflamatorias incluyen sin limitación IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-18.

10 Alternativamente o además, las presentes células pueden transformarse de manera estable o transitoria con un ácido nucleico de interés antes de la introducción en el sujeto. Las secuencias de ácido nucleico de interés incluyen, pero no se limitan a aquellas que codifican para productos génicos que potencian el crecimiento, la diferenciación y/o mineralización de osteoblastos. Por ejemplo, puede introducirse un sistema de expresión para BMP-2, de modo estable o transitorio con el fin de tratar osteoporosis o fracturas no consolidadas. Los expertos en la técnica conocen métodos de transformación celular.

15 La memoria descriptiva también describe una disposición que comprende un instrumento quirúrgico para la administración de una composición a un sujeto, tal como por ejemplo de manera sistémica, de manera tópica o en un sitio de lesión ósea, y que comprende además las células o poblaciones celulares tal como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende dichas células o poblaciones celulares, en el que la disposición está adaptada para la administración de la composición farmacéutica por ejemplo de manera sistémica, de manera tópica o en un sitio de lesión ósea. Por ejemplo, un instrumento quirúrgico adecuado puede inyectar una composición líquida que comprende células de la presente invención, tal como de manera sistémica, de manera tópica o en un sitio de lesión ósea.

20 Las células o poblaciones celulares pueden administrarse de manera que les permita injertarse o migrar al sitio de tejido pretendido y reconstituir o regenerar el área funcionalmente deficiente. Por ejemplo, las células pueden administrarse en un sitio de lesión musculoesquelética. Por ejemplo, puede facilitarse la osteogénesis de acuerdo con una intervención quirúrgica para remodelar tejido o insertar una férula, o un dispositivo protésico tal como una prótesis de cadera. En otras circunstancias, no se requerirá cirugía invasiva, y la composición puede administrarse mediante inyección o (por ejemplo, para la reparación de la columna vertebral) usando un endoscopio guiable.

25 En una realización, la preparación celular farmacéutica tal como se definió anteriormente puede administrarse en forma de composición líquida. En realizaciones, las células o la composición farmacéutica que comprende tales puede administrarse de manera sistémica, de manera tópica o en un sitio de lesión ósea.

30 En otra realización, las células o poblaciones celulares pueden transferirse a y/o cultivarse en un sustrato adecuado para proporcionar implantes. El sustrato en el que pueden aplicarse y cultivarse las células puede ser un metal, tal como titanio, aleación de cobalto/cromo o acero inoxidable, una superficie bioactiva tal como un fosfato de calcio, superficies de polímero tales como de polietileno, y similares. Aunque se prefiere menos, también puede usarse como sustrato material silíceo tal como vitrocerámicas. Lo más preferido son los metales, tales como titanio, y fosfatos de calcio, aunque el fosfato de calcio no es un componente indispensable del sustrato. El sustrato puede ser poroso o no poroso.

35 Por ejemplo, pueden transferirse células que han proliferado, o que están diferenciándose en placas de cultivo, sobre soportes sólidos tridimensionales con el fin de hacer que se multipliquen y/o continúen con el proceso de diferenciación incubando el soporte sólido en un medio líquido con nutrientes descrito en el presente documento, si es necesario. Pueden transferirse las células sobre un soporte sólido tridimensional, por ejemplo impregnando dicho soporte con una suspensión líquida que contiene dichas células. Los soportes impregnados obtenidos de este modo pueden implantarse en un sujeto humano. Tales soportes impregnados también pueden volver a cultivarse sumergiéndolos en un medio de cultivo líquido, antes de implantarse finalmente.

40 Es necesario que el soporte sólido tridimensional sea biocompatible de modo que permita que se implante en un ser humano. Puede ser de cualquier forma adecuada tal como un cilindro, una esfera, una placa o una parte de una forma arbitraria. De los materiales adecuados para el soporte sólido tridimensional biocompatible, puede hacerse una mención particular del carbonato de calcio, y en particular aragonita, específicamente en forma de esqueleto de coral, cerámicas porosas a base de alúmina, de zircona, de fosfato de tricalcio y/o hidroxiapatita, esqueleto de coral de imitación obtenido mediante intercambio hidrotermal que permite que el carbonato de calcio se transforme en hidroxiapatita, o si no vitrocerámicas de apatita-wollastonita, vitrocerámicas bioactivas tales como vidrios Bioglass(TM)..

45 Los aspectos y las realizaciones anteriores se respaldan adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitativos.

Los ejemplos demuestran que las células de formación de hueso, que presentan HLA de clase I y de clase II, de manera natural o inducida, pueden tener propiedades inmunorreguladoras interesantes ya que podrían modular la proliferación de células T mientras tienen altas capacidades de reconstrucción ósea. Estas células de formación de

hueso se caracterizan por altos niveles de expresión de marcadores de superficie de hueso y mesenquimatosos y alta capacidad de mineralización subyacente a su potencial biológico en hueso.

5 Se caracterizan por la expresión de moléculas de HLA de clase I y HLA de clase II en sus superficies y por una ausencia de moléculas coestimuladoras. Además, la molécula de HLA de clase II puede regularse por diferentes moléculas inmunoestimuladoras (tales como, entre otras,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ).

Estas células de formación de hueso pueden regular por disminución la respuesta proliferativa de células T estimuladas de modo autólogo y alogénico. Esto demuestra que los productos de células de formación de hueso tanto autólogas como alogénicas serán particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario.

10 Además, y de manera sorprendente con respecto a las propiedades inmunosupresoras mencionadas anteriormente, estas células de formación de hueso también pueden desempeñar un papel de células presentadoras de antígeno (APC) y, por tanto, pueden estimular la proliferación de células T y otras células inflamatorias.

15 Además, se realizó un pequeño ensayo clínico aleatorizado, controlado por referencia, que demostró de manera convincente los efectos beneficiosos de estas células de formación de hueso en un estado grave asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, concretamente en osteonecrosis de estadio I o II de la cabeza femoral asociada con inmunosupresión crónica debido a la administración de altas dosis orales de corticosteroides para el trasplante de órganos, enfermedad autoinmunitaria o asma grave.

20 Conjuntamente, los datos sugieren que las células serán particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades o estados asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión, opcionalmente en las que tales enfermedades implican una componente de disfunción ósea o lesión ósea, incluyendo enfermedades o estados óseos asociados con inmunodeficiencia o inmunosupresión.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la mineralización por células de formación de hueso positivas para HLA-II.

25 La figura 2 ilustra la expresión de ALP por células de formación de hueso positivas para HLA-II. La figura 2A muestra la tinción con HLA-DR de las células. La figura 2B muestra la tinción con ALP de las células. En cada figura, el panel superior muestra la tinción de control, el panel central muestra la tinción con HLA-DR o ALP respectivamente, y el panel inferior muestra una superposición.

La figura 3 ilustra la evolución de EVA en pacientes de control (CTRL) frente a tratados con APC-OB.

La figura 4 ilustra la evolución del índice WOMAC™ en pacientes CTRL frente a tratados con APC-OB.

30 La figura 5 ilustra el análisis de supervivencia a la lesión ósea en pacientes CTRL frente a tratados con APC-OB.

La figura 6: evolución de la puntuación radiológica en pacientes CTRL frente a tratados con APC-OB.

#### Ejemplo 1

35 *Análisis fenotípico.* Se analizaron marcadores de superficie celular inmunobiológicos de las células mediante citometría de flujo. Se incubaron células de formación de hueso con los siguientes anticuerpos monoclonales marcados: HLA-I, HLA-DR, CD80, CD86, CTLA-4, CD40L y CD28 durante 15 min y luego se lavaron con PBS antes de centrifugarse y resuspenderse en 0,3 ml de PBS.

40 *Diferenciación celular.* Se generaron osteoblastos positivos para HLA de clase II tal como se usa en los ejemplos a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) *in vitro* usando un medio de cultivo osteogénico convencional (incluyendo DMEM medio o  $\alpha$ -MEM complementado con FCS al 10% o suero o plasma autólogo o alogénico, dexametasona ( $10^{-8}$  M), ácido ascórbico (50  $\mu$ g/ml), y  $\beta$ -glicerofosfato (10 mM)) complementado con FGF-2 (10 ng/ml).

45 *Ensayo de mineralización – diferenciación de células mesenquimatosas de médula ósea en medio osteogénico.* Se recuperan células del cultivo mediante incubación con tripsina o Versene y se siembran en placa a de 60 a 120.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos en el medio de expansión (12.500 células/cm<sup>2</sup>). Al día siguiente, se sustituye el medio por 2,5 ml de medio osteogénico. Se cultivan las células durante 2, 3 ó 4 semanas. Se sustituye el medio cada 3-4 días. Después de 2 semanas de cultivo, se fijaron células en formaldehído al 3,7%/PBS y se tiñeron mediante rojo de alizarina

#### Medios.

50 Dilución de dexametasona:

## ES 2 649 337 T3

Dex1 ( $5 \cdot 10^{-4}$  M): 2  $\mu$ l de disolución madre de dexametasona ( $5 \cdot 10^{-2}$  M) + 198  $\mu$ l de  $\alpha$ MEM

Dex2 ( $10^{-6}$  M): 2  $\mu$ l de Dex1 (5,10-4M) + 998  $\mu$ l de  $\alpha$ MEM

### Medio osteogénico (40 ml)

	Volumen	Conc. final
$\alpha$ MEM	31 ml	/
FCS	6 ml	15%
PenEstrepGlu (100x)	400 $\mu$ l	1x
Dexamet. (Dex2)	400 $\mu$ l	$10^{-8}$ M
Ácido ascórbico	200 $\mu$ l	50 $\mu$ g/ml
$\beta$ -glicerofosfato	2 ml	10 mM

5 *Ensayo de proliferación.* Se sembraron en placa 200.000 células T humanas/ml del individuo A (PBMCA) en placa de microtitulación de 96 pocillos con células de formación de hueso humanas irradiadas del individuo B (OBb) durante 7 días en un volumen total de 200  $\mu$ l y en presencia o ausencia de PHA (u otro agente estimulador).

10 Alternativamente, se sembraron en placa 200.000 células T humanas/ml de un individuo A (PBMCA) en placa de microtitulación de 96 pocillos con células de formación de hueso humanas irradiadas del individuo B (OBb) durante 7 días en un volumen total de 200  $\mu$ l y en presencia o ausencia de PBMCb del individuo b (o de PBMCc de un individuo c).

15 Se sembraron las células de formación de hueso a 100.000 células/ml. Se incubó el cultivo con 1  $\mu$ Ci/ml de  $^3$ H-timidina durante 18 h del periodo de cultivo para medir la proliferación de células T. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo y dos veces con ácido tricloroacético (TCA) al 5% enfriado en hielo. Finalmente, se lisaron las células mediante una disolución que contenía NaOH 0,1 N y Triton-X100 al 0,1%. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con líquido de centelleo para analizarse en un contador beta.

### Ejemplo 2

#### Fenotipo celular

20 La citometría de flujo mostró que esta población de células de formación de hueso expresaba marcadores mesenquimatosos (CD90, CD105 y CD73) a altos niveles. La molécula de superficie hematopoyética es débil (CD45, CD34) o está ausente (CD14, CD19). Las células expresaron un alto nivel de HLA de clase I pero de manera sorprendente, también un alto nivel de moléculas de HLA de clase II. Sin embargo, todas las moléculas coestimuladoras sometidas a prueba (CD80, CD86, CD28, CTLA-4) están ausentes (tabla 1).

25 De manera interesante, tal como se muestra por Le Blanc *et al* 2003 (Exp Hematol 31: 890-6) para células MSC, se observó que la presencia de IFN $\gamma$  (5 ng/ml) en el medio de cultivo durante de 24 a 48 h, indujo un aumento de expresión de HLA de clase II (tabla 1). Se realizaron observaciones similares con TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-18 y otras citocinas proinflamatorias.

Tabla 1: Marcadores fenotípicos de células de formación de hueso cultivadas en presencia de IFN $\gamma$  o no (porcentaje de células consideradas positivas mediante FACS)

	sin IFN $\gamma$			con IFN $\gamma$		
	N	Media	D.E.	N	Media	D.E.
ALP	17	67,9	16,6	8	75,2	13,1
CD105	17	92,8	3,9	8	89,9	4,9
CD90	12	95,7	4,0	8	94,8	1,9
CD73	13	94,7	3,4	8	96	2,8
CD45	17	2,8	3,3	8	1,4	2,1
CD14	12	3,2	3,9	8	2,1	1,7
CD19	13	4,8	4,8	8	2,3	2,3
HLA de clase II	16	68,3	18,9	8	92,3	7,2
HLA de clase I	16	93,8	3,0	8	96,1	4,5
CD86	14	4,3	4,8	8	6,9	3,1
CD28	14	3,6	3,5	8	4,2	2,1
CD80	15	2,1	2,2	8	3,2	2,0
CD40L	14	2,3	2,1	8	1,0	1,9
CTLA4	14	5,7	6,2	8	9,5	3,5

**Ejemplo 3**

Inmunomodulación

5 La población de células de formación de hueso población descrita anteriormente se verificó por su capacidad para regular el sistema inmunitario en estados *in vitro*. Se sometió a prueba la inducción o proliferación de células T (células mononucleares de sangre periférica, PBMC) en estados autólogos o heterólogos.

Se aislaron células de formación de hueso HLA de clase II+ y/o se expandieron a partir de pacientes que presentaban enfermedades óseas relacionadas con el sistema inmunitario. El nivel de expresión de su marcador de HLA de clase II mediante citometría de flujo y se usaron sus células (células de formación de hueso y/o PBMC) para ensayos de proliferación de células T.

10 No se observó respuesta proliferativa de PBMC, de un receptor a, cuando se realizó cocultivo con células de formación de hueso HLA de clase II+ ni en estados autólogos, de un receptor a, ni alogénicos, de un receptor b, (tabla 2). Esto demostró que las células de formación de hueso HLA de clase II+ no se reconocieron como células "foráneas" por células mononucleares de sangre periférica y, por tanto, no pudieron provocar una respuesta alogénica.

15 Además, cuando se estimularon mediante un activador mitogénico, tal como PHA, las PBMC estaban significativamente reguladas por disminución por las células de formación de hueso en estados o bien autólogos, de un donador a, o bien alogénicos, de un donador b. Se correlacionó el nivel de inmunosupresión con el nivel inicial de expresión de HLA de clase II (tabla 2).

20 Tabla 2: Efectos inhibidores de los osteoblastos sobre la proliferación de células T alogénicas (se presentan los valores como % de aumento o disminución, número de PBMC al inicio fijado en el 100%).

Células de formación de hueso					
MSC n°	HLA II	PBMCa	PBMCa+ OBb	PBMCa + PHA	PBMCa + PHA + OBb
3	52,8%	100%	107%	700%	425% (61%)*
1	64,2%	100%	89%	912%	500% (55%)
2	85,1%	100%	100%	640%	240% (37%)
4	87,3%	100%	104%	479%	187% (39%)

\* % de los niveles de PBMC-PHA

No se modificaron estos efectos mediante el pretratamiento con citocinas proinflamatorias

**Ejemplo 4**

Propiedades de presentación de antígeno

25 La adición de una segunda reserva de PBMC de otro donante conduce a un aumento de la proliferación de las PBMC del receptor, lo que sugiere un papel de APC de las células de formación de hueso HLA de clase II+ (tabla 3). Esa observación se correlaciona también con los niveles de expresión de HLA de clase II.

Tabla 3: Efectos proliferativos de células de formación de hueso sobre la proliferación de células T (de un receptor) en presencia de PBMC de otro donante (se presentan los valores como % de aumento o disminución, número de PBMC al inicio fijado en el 100%)

Células de formación de hueso						
MSC n°	HLA II	PBMCa	PBMCa+ OBb	PBMCa + PHA	PBMCa + PHA + OBb	PBMCa + PHA + OBb + PBMCb
6	52,8%	4,200	171%	262%	1488%	1697%
5	64,2%	3,400	238%	341%	1676%	2329%
8	75,1%	4,000	126%	327%	1450%	2225%
7	88,4%	4,800	202%	418%	1572%	2789%

30 De manera interesante, la adición de determinadas citocinas específicas tales como IL2, IL3, IL4, IL11, IL12 o PBMC desde el comienzo del cultivo celular, conduce a un aumento de la proliferación de las PBMC, lo que sugiere un papel de APC de las células de formación de hueso HLA de clase II+ (tabla 4). Esa observación se correlaciona también con los niveles de expresión de HLA de clase II. No se modificaron estos efectos mediante el pretratamiento con citocinas proinflamatorias.

35 Tabla 4: Efectos proliferativos de células de formación de hueso sobre la proliferación de células T (de un receptor) en presencia de IL2 (se presentan los valores como % de aumento o disminución, número de PBMC al inicio fijado en el 100%)

Células de formación de hueso						
MSC n°	HLA II	PBMCa	PBMCa+ OBb	PBMCa + PHA	PBMCa + PHA + OBb	PMBCa + PHA + OBb + IL2
11	49,8%	100%	152%	272%	1138%	1492%
17	66,2%	100%	207%	348%	1346%	2029%
12	79,1%	100%	141%	321%	1510%	2259%

No se modificaron estos efectos mediante el pretratamiento con citocinas proinflamatorias.

### Ejemplo 5

#### Propiedades de reconstrucción ósea

5 Se evaluaron el nivel de marcadores celulares (marcadores óseos y mesenquimatosos) o marcadores de membrana mediante citometría de flujo (tabla 1). Los marcadores óseos (ALP) y mesenquimatosos (CD105, 73, 90) se expresaron altamente con niveles en >65% y >95%

Se realizó la correlación con la función biológica del hueso con la producción de ALP (tinción con ALP) y el nivel de expresión del marcador de HLA de clase II (mineralización, figura 1) lo que sugiere que las células que expresan un alto nivel de moléculas de HLA de clase II pueden tener un alto potencial de reconstrucción ósea.

10 Se expresó ALP mediante la mayor parte, si no todas las células (en células incubadas con IFN $\gamma$ ) (figura 2).

### Ejemplo 6

#### Datos de eficacia clínica en seres humanos

##### *Diseño del estudio y poblaciones de pacientes*

15 Se realizó un pequeño ensayo clínico, aleatorizado, controlado por referencia, en el que ocho pacientes con un estado grave asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión (es decir, osteonecrosis de estadio I o II de la cabeza femoral) se trataron mediante descompresión del núcleo asociada con implantación en la lesión o bien de células de formación de hueso que presentan características de APC tales como las obtenidas anteriormente (APC-OB, pacientes n.<sup>os</sup> 4 a 8) o bien una población de células del estroma mesenquimatosas derivadas de médula ósea (tratamiento de control, CTRL, pacientes n.<sup>os</sup> 1 a 4).

20 En estos pacientes, la inmunosupresión crónica se debía a la administración de altas dosis orales de corticosteroides para trasplante de órganos, enfermedad autoinmunitaria o asma grave.

25 Se investigó la eficacia del tratamiento usando criterios y parámetros de valoración tanto clínicos (dolor y función de cadera, según se mide usando la escala analógica visual, EVA y el índice WOMAC™, respectivamente) como radiológicos (evidencias mediante rayos X e IRM de progresión hacia estadios III o IV de fractura, según la clasificación de osteonecrosis de ARCO). Se evaluaron los pacientes sistémicamente y se realizó un seguimiento durante 24 meses.

##### *Resultados del estudio*

#### 1. Síntomas clínicos

##### 1.1 Dolor

30 En conjunto, se observó una reducción del dolor en el grupo tratado con APC-OB tras de 12 a 24 meses en comparación con el grupo CTRL.

35 En el grupo tratado con APC-OB, las puntuaciones de dolor medias, evaluadas mediante EVA, disminuyeron desde 45,5 ( $\pm$  23) en el nivel inicial hasta 16,3 ( $\pm$  14) a los tres meses, 17,8 ( $\pm$  15) a los seis meses, 15 ( $\pm$  11) a los doce meses, 16,8 ( $\pm$  11) a los dieciocho meses, y 7,8 ( $\pm$  12) a los veinticuatro meses. En cambio, se encontró un aumento en las puntuaciones de dolor medias en el grupo CTRL, desde 49 ( $\pm$  32) en el nivel inicial hasta 60,5 ( $\pm$  30,7) y 58,5 ( $\pm$  18) a los dieciocho y veinticuatro meses, respectivamente.

A lo largo del tiempo, los beneficios del tratamiento con APC-OB se traducen en diferencias entre los dos grupos a los veinticuatro meses de más del 100% (véase la figura 3).

##### 1.2. Puntuaciones funcionales

40 De manera similar, en el grupo tratado con APC-OB, el índice WOMAC™ medio disminuyó desde 48 ( $\pm$  25) en el nivel inicial hasta 17,8 ( $\pm$  23) a los tres meses, 20,5 ( $\pm$  24) a los seis meses, 15,5 ( $\pm$  12) a los doce meses, 18 ( $\pm$  11) a los dieciocho meses, y 18 ( $\pm$  8) a los veinticuatro meses. A la inversa, el índice WOMAC™ se deterioró en los grupos CTRL a lo largo del mismo periodo de tiempo, desde 39,8 ( $\pm$  25) en el nivel inicial hasta 56,8 ( $\pm$  22) y 57 ( $\pm$

26) a los dieciocho y veinticuatro meses, respectivamente.

A lo largo del tiempo, los beneficios del tratamiento con APC-OB se traducen en diferencias entre los dos grupos a los veinticuatro meses de más del 100% (véase la figura 4).

### 1.3 Progresión radiológica

5 A los 24 meses, un análisis de supervivencia demostró que el 75% de las lesiones óseas en el grupo CTRL se habían deteriorado para dar fracturas frente a ninguna en el grupo tratado con APC-OB (figura 5).

Además, tal como se muestra en la figura 6 que ilustra la evolución de la puntuación radiológica media en los dos grupos de pacientes, en el grupo CTRL la puntuación radiológica media se deterioró desde 1,3 en el nivel inicial hasta 2 a los tres meses, 2,5 a los seis meses, 2,8 a los doce meses y 3 a los dieciocho meses y veinticuatro meses.

10 En comparación, los pacientes tratados con APC-OB sólo mostraron un aumento mínimo en las puntuaciones radiológicas medias, desde 1,5 en el nivel inicial hasta 1,5, 1,8 y 1,8 a los doce, dieciocho y veinticuatro meses, respectivamente.

### Conclusiones

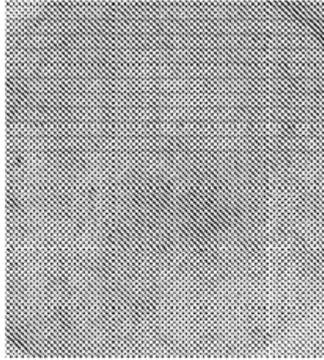
15 En conclusión, los datos indican que los pacientes (con osteonecrosis de estadio I o II de la cabeza femoral relacionada con inmunosupresión inducida por corticoides) que recibieron tratamiento con células de formación de hueso que presentaban características de APC mostraron una notable mejora de los parámetros de valoración clínicos y radiológicos, en comparación con el grupo de control.

**REIVINDICACIONES**

1. Células de formación de hueso aisladas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, en las que dichas células de formación de hueso son osteoblastos u osteocitos y en las que las células de formación de hueso comprenden la expresión de HLA-II, y en las que dicha enfermedad o dicho estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión es osteoporosis, osteopenia, fragilidad ósea, necrosis ósea, fractura ósea, microfracturas óseas o osteólisis de hueso.  
5
2. Células de formación de hueso aisladas para su uso según la reivindicación 1, en las que las células de formación de hueso presentan las siguientes características:  
10
  - a) las células comprenden la expresión de fosfatasa alcalina (ALP);
  - b) las células comprenden la expresión de uno cualquiera o más de propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP), osteonectina (ON), osteopontina (OP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP);
  - c) las células muestran evidencias de capacidad para mineralizar el entorno externo, o sintetizar matriz extracelular que contiene calcio;
  - d) las células comprenden la expresión de HLA-I y HLA-II.
3. Células de formación de hueso aisladas para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en las que dichas células de formación de hueso pueden obtenerse mediante diferenciación a partir de células madre mesenquimatosas (MSC) o células del estroma de la médula ósea (BMSC).  
20
4. Células de formación de hueso aisladas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que dichas células de formación de hueso muestran evidencias de propiedades de presentación de antígeno.  
25
5. Células de formación de hueso aisladas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que las células de formación de hueso son de origen humano y el medicamento va a emplearse para la administración autóloga o alogénica a sujetos humanos.
6. Composición farmacéutica que comprende células de formación de hueso que comprenden la expresión de HLA-II y una citocina proinflamatoria, para el uso simultáneo, secuencial o independiente en el tratamiento de una enfermedad o un estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión, en la que dicha enfermedad o dicho estado óseo asociado con inmunodeficiencia o inmunosupresión es osteoporosis, osteopenia, fragilidad ósea, necrosis ósea, fractura ósea, microfracturas óseas u osteólisis de hueso.  
30
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la citocina proinflamatoria es IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 o IL-18.

**FIG 1**

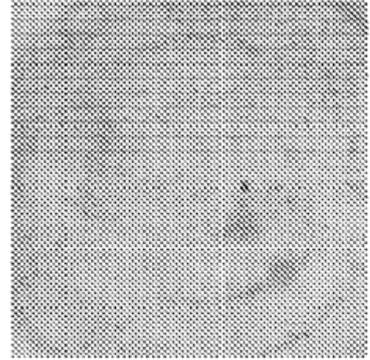
*HLA de clase II*     **64,2%**

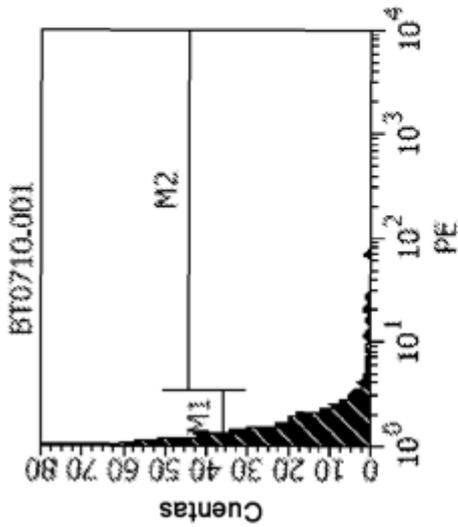


**70,1%**



**52,8%**

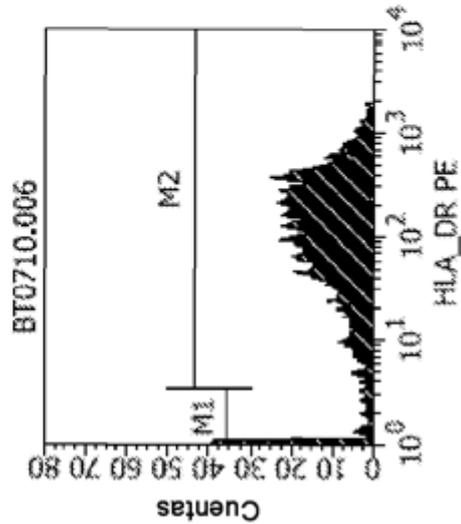




Archivo: BT0710.001  
 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5040  
 Eventos totales: 5040  
 Parámetro X: PE (Log)

Marcador	izqda.	Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910		5040	100,00	100,00	1,28	96,47	1,00
M1	1, 3		4989	98,99	98,99	1,21	32,44	1,00
M2	3, 9910		53	1,05	1,05	7,72	123,36	4,41

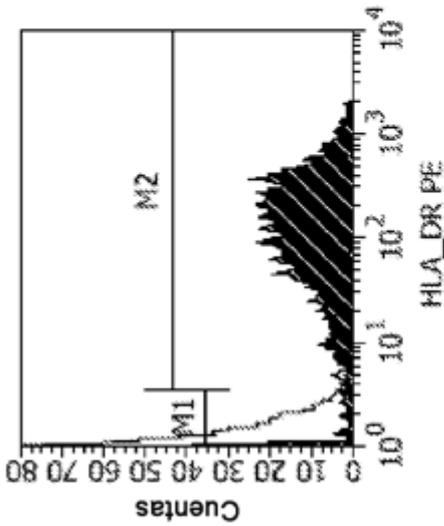
FIG. 2A (I)



Archivo: BT0710.006  
 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5010  
 Eventos totales: 5010  
 Parámetro X: HLA\_DR PE (Log)

Marcador	izqda.	Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910		5010	100,00	100,00	181,58	107,41	118,64
M1	1, 3		113	2,26	2,26	1,81	45,01	1,50
M2	3, 9910		4898	97,76	97,76	185,69	105,19	121,88

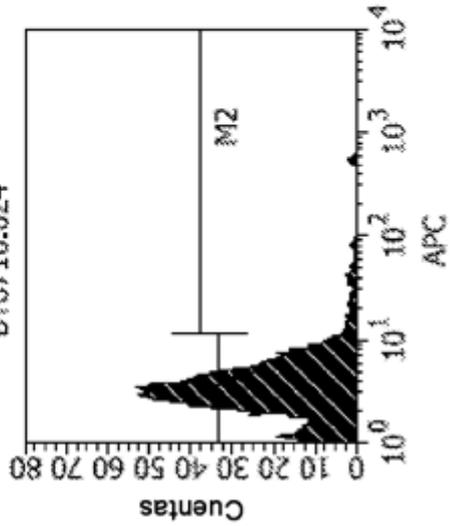
FIG. 2A (II)



Archivo: BT0710.006 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5010  
 Parámetro X: HLA\_DR PE (Log)

Marcador Izqda.	Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910	5010	100,00	100,00	181,58	107,41	118,64
M1	1, 3	113	2,26	2,26	1,81	45,01	1,60
M2	3, 9910	4898	97,76	97,76	185,69	105,19	121,88

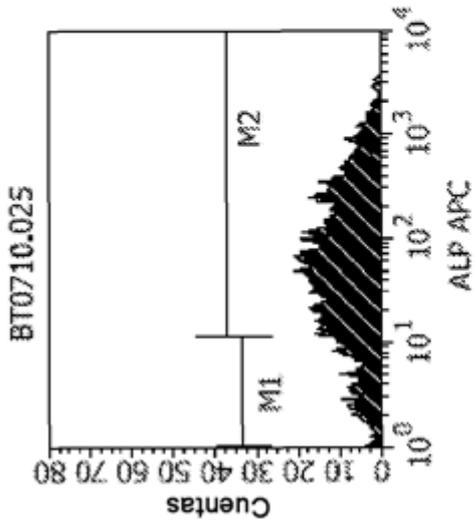
FIG. 2A (III)



Archivo: BT0710.024 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5145  
 Parámetro X: APC (Log)

Marcador Izqda.	Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910	5145	100,00	100,00	3,89	195,33	3,19
M1	1, 11	5089	98,91	98,91	3,60	49,36	3,19
M2	11, 9910	57	1,11	1,11	30,09	218,50	15,82

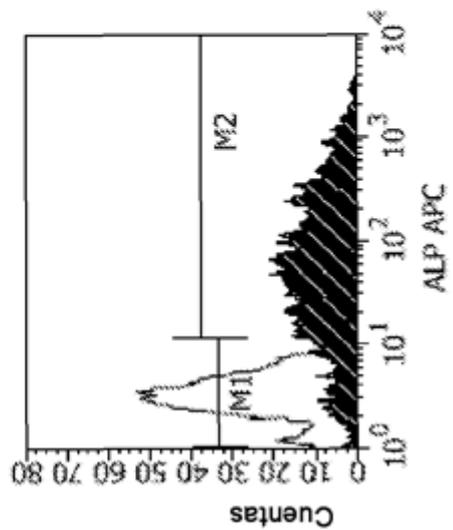
FIG. 2B (I)



Archivo: BT0710.025  
 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5055  
 Eventos totales: 5055  
 Parámetro X: ALP APC (Log)

Marcador	Izqda., Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910	5055	100,00	100,00	139,25	164,28	52,33
M1	1, 11	854	16,89	16,89	5,69	53,53	5,14
M2	11, 9910	4210	83,28	83,28	166,07	145,69	71,05

FIG. 2B (II)



Archivo: BT0710.025  
 Fecha de adquisición: 21 de mayo de 2007  
 Eventos regulados: 5055  
 Eventos totales: 5055  
 Parámetro X: ALP APC (Log)

Marcador	Izqda., Dcha.	Eventos	%Regulado	% Total	Media	CV	Mediana
All	1, 9910	5055	100,00	100,00	139,25	164,28	52,33
M1	1, 11	854	16,89	16,89	5,69	53,53	5,14
M2	11, 9910	4210	83,28	83,28	166,07	145,69	71,05

FIG. 2B (III)

FIG 3

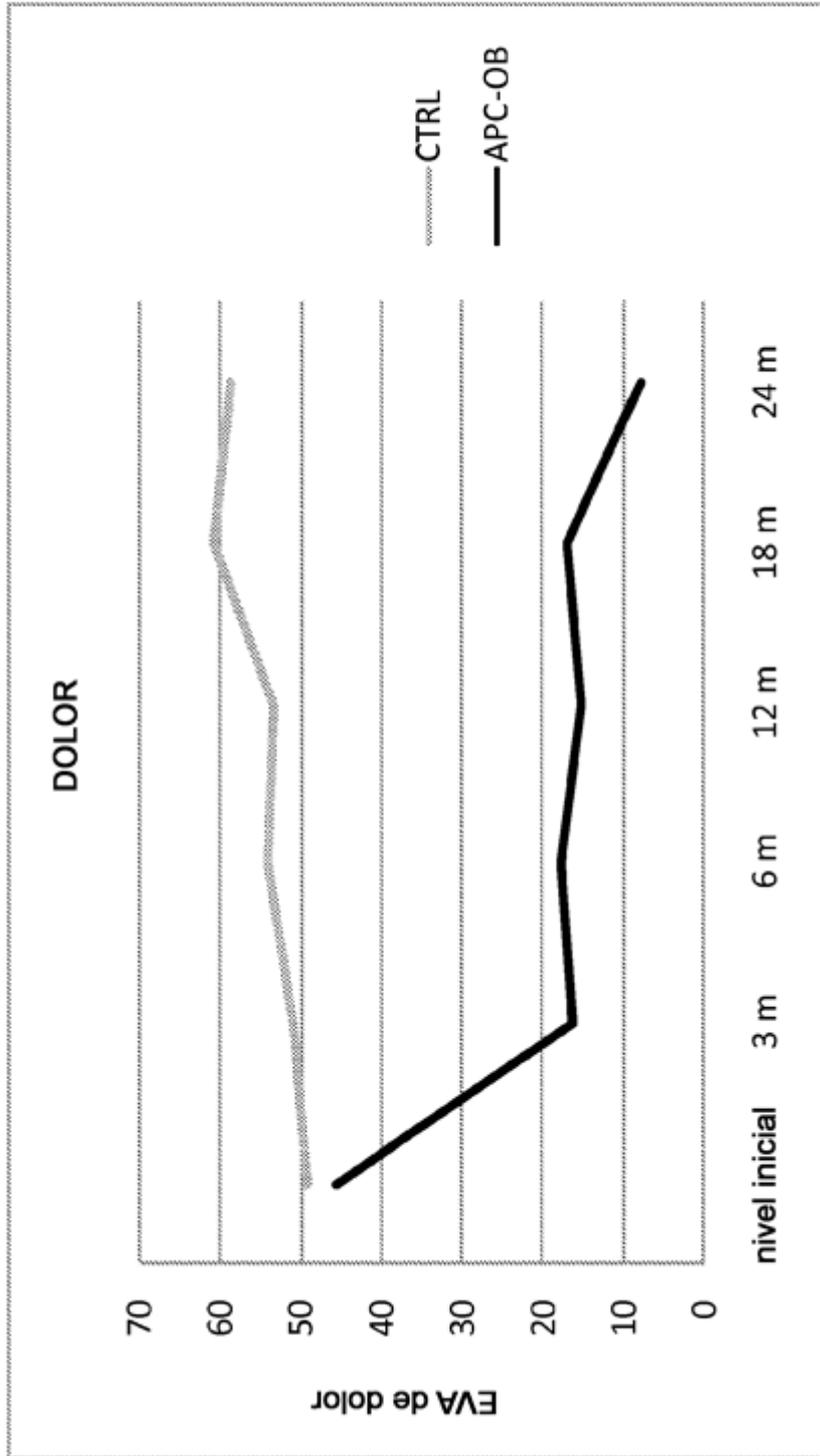


FIG 4

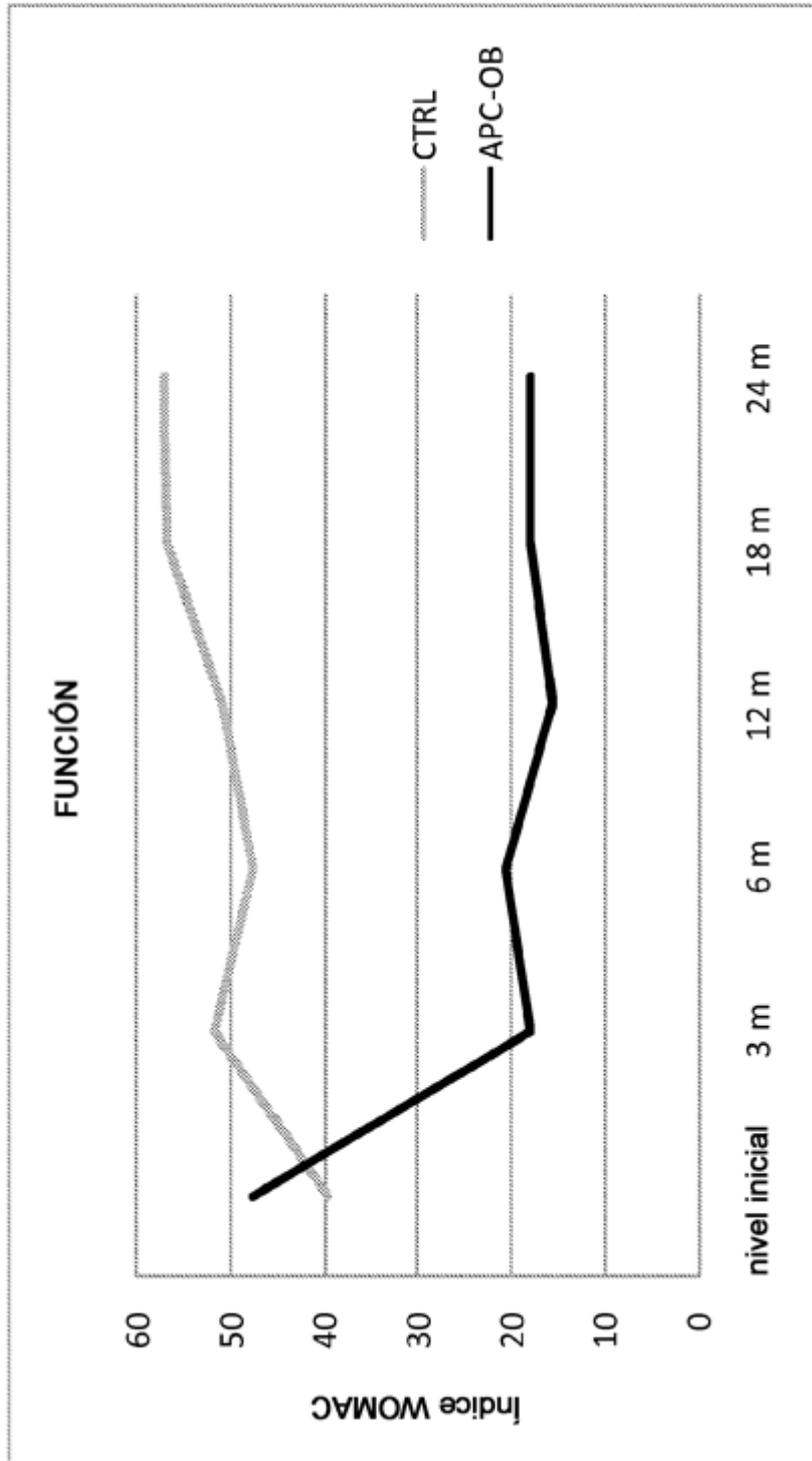


FIG 5

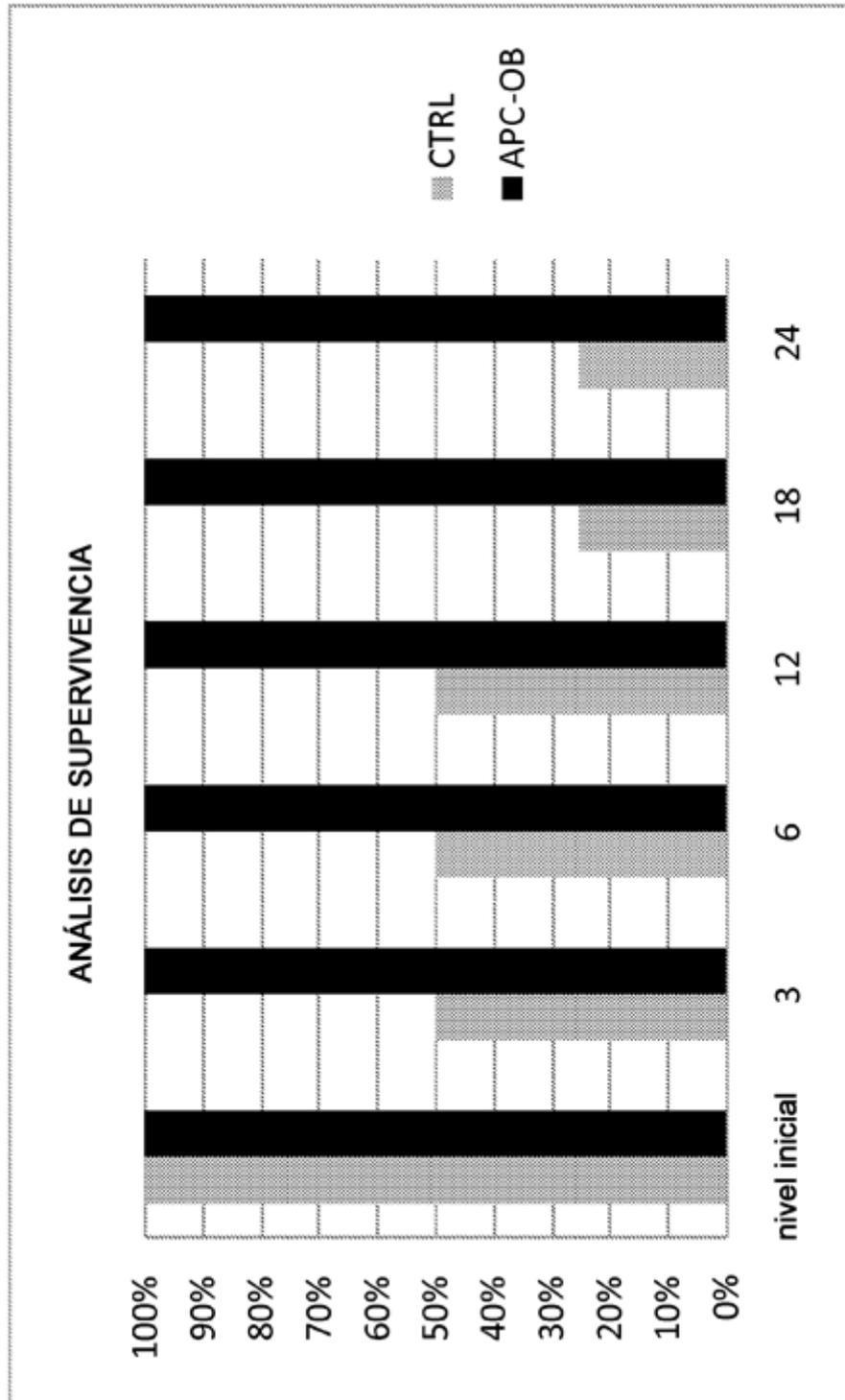


FIG 6

