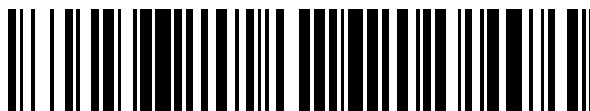


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 482**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2014 PCT/EP2014/066600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014988**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2014 E 14748175 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3028052**

54 Título: **Método para predecir la respuesta al tratamiento y prueba para el uso seguro de células madre mesenquimatosas en enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

01.08.2013 EP 13382315

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

12.04.2018

73 Titular/es:

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y SALUD (50.0%)

Avenida Americo Vespucio, 5 Bloque 2, 2º Planta Izq. (Isla de la Cartuja)

41092 Sevilla, ES y

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (50.0%)

72 Inventor/es:

SORIA ESCOMS, BERNAT;

HMADCHA, ABDELKRIM;

ACOSTA LÓPEZ, LOURDES y

ESCACENA ACOSTA, NATALIA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 663 482 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

Método para predecir la respuesta al tratamiento y prueba para el uso seguro de células madre mesenquimatosas en enfermedades inflamatorias.

Campo de la invención

La invención se refiere al campo del pronóstico médico, más específicamente al pronóstico de pacientes con enfermedades inflamatorias tratados con composiciones de células madre mesenquimatosas aisladas.

Antecedentes de la invención

La cicatrización es un proceso complejo que implica la interacción de inflamación, reepitelización, angiogénesis, depósito de matriz extracelular y remodelación. Este proceso es esencial para mantener la integridad del tejido normal. En individuos con diabetes *mellitus*, la herida permanece en un estado inflamatorio crónico y no cicatriza de manera oportuna y ordenada. Se ha demostrado que células madre se movilizan y migran al tejido isquémico y herido donde secretan quimiocinas y factores del crecimiento que promueven la angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular, creando un entorno local que conduce a la cicatrización (Wu *et al.*, 2007. *Stem Cells* 25: 2648-59). La terapia con células madre para el tratamiento de EAP (enfermedad arterial periférica) no revascularizable diabética es un abordaje con resultados preliminares prometedores (Ruiz-Salmeron *et al.*, 2011. *Cell Transplant.* 20: 1629-39). En pacientes diabéticos con isquemia crítica de las extremidades inferiores (CLI), la perfusión intraarterial de células mononucleares de médula ósea es un procedimiento seguro que genera un aumento significativo en la red vascular en áreas isquémicas y promueve una notable mejoría clínica (Ruiz-Salmeron *et al.*, 2011. *Cell Transplant.* 20: 1629-39). Además, se ha notificado que las AdMSC pueden trasplantarse de manera autóloga directamente a la herida, promoviendo una cicatrización mejorada de heridas diabéticas (Blumberg *et al.*, 2012. *Diabetes Res Clin Pract* 96: 1-9), contribuyendo a la formación de vasos sanguíneos y la regeneración subcutánea. Las AdMSC liberan múltiples factores del crecimiento, incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor 2 de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), promoviendo la angiogénesis terapéutica en tejidos isquémicos (Kilroy *et al.*, 2007. *J Cell Physiol* 212: 702-9; Kim *et al.*, 2007. *J Dermatol Sci* 48: 15-24; Nakagami *et al.*, 2005. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2542-47). Incluso más importante, las células estromales mesenquimatosas presentan propiedades antitrombogénicas y antiinflamatorias (Hashi *et al.*, 2007. *PNAS* 104: 11915-20; Prockop *et al.*, 2012. *Mol Ther* 20: 14-20). Aunque los mecanismos de migración de las MSC no se entienden bien, las propiedades antiinflamatorias y antitrombogénicas de las MSC dieron lugar al uso parenteral o local de estas células para promover la cicatrización y regeneración de tejidos dañados. En este contexto, los autores de la presente invención y colaboradores han llevado a cabo un estudio clínico para evaluar la seguridad y viabilidad de la administración intraarterial de AdMSC (células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo) autólogas en 36 pacientes diabéticos con CLI. Por desgracia, dos pacientes desarrollaron un acontecimiento adverso que consistía en la aparición de microtrombosis distal que podía controlarse con un tratamiento antitrombótico intensivo. En cambio, los autores de la presente invención no observaron ninguna reacción adversa cuando se usaron AdMSC autólogas de pacientes no diabéticos en las mismas condiciones. La reacción adversa observada contradice las propiedades fibrinolíticas descritas de las MSC (Hashi *et al.*, 2007. *PNAS* 104: 11915-20; Prockop *et al.*, 2012. *Mol Ther* 20: 14-20; Neuss *et al.*, 2010. *Cells Tissues Organs* 191: 36-48). Por consiguiente, actualmente existe la necesidad de proporcionar una prueba, un método y un kit de seguridad, con el fin de determinar la respuesta al tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria y asignar al sujeto humano a uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende sujetos con bajo riesgo de presentar un episodio trombótico tras el tratamiento; y en el que el grupo 2 representa los sujetos restantes.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y/o inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

a. obtener una muestra de MSC aisladas;

b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,

c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

5 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, expresión aumentada se define como un nivel de expresión mayor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales. En una realización más preferida de la invención, aumentado se define como un nivel de expresión mayor que o igual a dos veces, preferiblemente tres veces, la expresión de proteína tPA o ARNm que codifica el tPA en MSC en condiciones de cultivo normales.

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

15 a. obtener una muestra de MSC aisladas,

b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,

20 c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

25 en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de PAI-1, o ARN que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

30 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales. En una realización más preferida de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que o igual a 1/2, preferiblemente menor que o igual a 1/3, de la expresión de proteína PAI-1 o ARNm que codifica el PAI-1, en MSC en condiciones de cultivo normales.

35 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

40 a. obtener una muestra de MSC aisladas,

b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,

45 c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, y proteína del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

50 en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo y si los niveles de expresión de PAI-1, o ARNm que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

55 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales y en el que expresión aumentada se define como un nivel de expresión superior a la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales. En una realización más preferida de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que o igual a 1/2, preferiblemente menor que o igual a 1/3, de la expresión de proteína PAI-1 o ARN que codifica el PAI-1, en MSC en condiciones de cultivo normales y en el que expresión aumentada se define como un nivel de expresión mayor que o igual a dos veces, preferiblemente tres veces, la expresión de proteína tPA o ARNm que codifica el tPA en MSC en condiciones de cultivo normales.

60 En una realización preferida de cualquiera de los aspectos segundo, tercero o cuarto de la invención, la enfermedad inflamatoria se selecciona de la lista que consiste en: diabetes tipo 2, enfermedad vascular periférica e isquemia crítica de las extremidades inferiores.

65 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método para asignar un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria a uno de dos grupos, en el que grupo 1 comprende sujetos identificables mediante el

método según uno cualquiera de los aspectos segundo, tercero o cuarto de la invención como sujetos humanos con respuesta positiva; y en el que el grupo 2 representa los sujetos restantes. También se divulga una composición farmacéutica que comprende MSC aisladas, para tratar un sujeto humano del grupo 1 tal como resulta identificable mediante el método del quinto aspecto de la invención, en el que preferiblemente la composición farmacéutica también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un principio activo adicional.

En una realización preferida del sexto aspecto de la invención, las MSC aisladas son MSC humanas (hMSC), más preferiblemente hMSC autólogas y todavía más preferiblemente hMSC cultivadas derivadas de médula ósea. También se divulga un kit adecuado para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, que comprende al menos un(os) oligonucleótido(s) capaz/capaces de hibridar con los ARNm de cualquier tPA y/o PAI-1. También se divulga un kit adecuado para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, que comprende un medio que tiene al menos un anticuerpo de captura capaz de complejarse con cualquier proteína biomarcadora tPA o PAI-1 o un fragmento de las mismas y un ensayo para la detección de un complejo del biomarcador y el anticuerpo de captura.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Caracterización de AdMSC. (a-i) Análisis de citometría de flujo de marcadores de la superficie celular de AdMSC, histogramas representativos (línea negra), y sus respectivos controles (línea gris). (j) Morfología de poblaciones de AdMSC, presentaban una morfología en forma de huso; (k) diferenciación de adipogénesis, detectada mediante la formación de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas teñidas con aceite rojo O; (l) se demostró la diferenciación osteogénica mediante depósito de calcio mostrado mediante tinción con rojo de alizarina.

Figura 2: Detección de la expresión de ARNm de tPA (a) y liberación de proteínas (b) en AdMSC de control humano (AdMSC), paciente con CLI diabética (AdMSC-D) y paciente con CLI no diabética (AdMSC-ND) tras la estimulación con complemento de crecimiento (control), suero sanguíneo de control humano (hBS), paciente con CLI diabética (hBSD) y paciente con CLI no diabética (hBSND). La expresión de ARNm relativa indica la razón entre gen específico y genes de mantenimiento. Los valores se normalizan para la expresión en AdMSC no estimuladas, que se estableció arbitrariamente en 1. Los datos se representan como valores medios \pm EEM. $n = 4$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Figura 3: Detección de la expresión de ARNm de PAI-1 (a) y liberación de proteínas (b) en AdMSC de control humano (AdMSC), paciente con CLI diabética (AdMSC-D) y paciente con CLI no diabética (AdMSC-ND) tras la estimulación con complemento de crecimiento (Control), suero sanguíneo de control humano (hBS), paciente con CLI diabética (hBSD) y paciente con CLI no diabética (hBS-ND). La expresión de ARNm relativa indica la razón entre gen específico y genes de mantenimiento. Los valores se normalizan para la expresión en AdMSC no estimuladas, que se estableció arbitrariamente en 1. Los datos se representan como valores medios \pm EEM. $n = 4$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Figura 4: AdMSC cultivadas en coágulos de fibrina, tras 24 h la lisis mediada por hMSC del coágulo de fibrina se hizo evidente, ya que una zona de aclaramiento rodeaba cada célula (a). La cuantificación de células libres/área (b) y agregados/área (c) muestra menos células AdMSC-D libres y mayores agregados de células AdMSCD. Detección de (dímeros D) un producto de degradación de fibrina (d) en AdMSC de control humano (AdMSC), paciente con CLI diabética (AdMSC-D) y paciente con CLI no diabética (AdMSC-ND) tras la estimulación de coágulos de fibrina con complemento de crecimiento (control), suero sanguíneo de control humano (hBS), paciente con CLI diabética (hBS-D), y paciente con CLI no diabética (hBS-ND). Los datos se representan como valores medios \pm EEM. $n = 4$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos de uso de marcadores de proteína tPA y/o PAI-1, o ARNm que codifica estas proteínas, como indicadores de buena respuesta frente a una respuesta con alta probabilidad de padecer un episodio trombótico tras el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria con células madre mesenquimatosas.

Con el fin de evaluar el mecanismo molecular que subyace a la formación y lisis de coágulos en pacientes que reciben un tratamiento con MSC (células madre mesenquimatosas), los inventores se centraron en factores clave de la cascada fibrinolítica (tPA y PAI-1) tras la estimulación de AdMSC (células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo) con suero sanguíneo de pacientes con CLI bien diabéticos o bien no diabéticos. También se estudiaron las reacciones e interacciones celulares de AdMSC con la matriz de fibrina y su capacidad fibrinolítica.

A partir de los resultados mostrados en la figura 1 a 4, puede concluirse claramente que niveles aumentados de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA (activador del plasminógeno de tipo tisular) en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo, y/o niveles disminuidos de proteína PAI-1 o de ARNm que codifica el PAI-1 en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo, se correlacionan significativamente con una mejor tasa de respuesta, concretamente un riesgo reducido de padecer un episodio

trombótico tras el tratamiento con MSC. Estos resultados demuestran claramente la utilidad de estos marcadores, tPA y/o PAI-1, como indicadores de supervivencia.

5 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y/o el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), para pronosticar o predecir la respuesta de un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria. En una realización preferida, tPA y PAI-1 se usan simultáneamente.

10 Se indica que el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA; PLAT; TPA; alteplasa; activador del plasminógeno, tipo tisular; reteplasa; activador del plasminógeno t; activador del plasminógeno tisular (t-PA); activador del plasminógeno, tejido) se localiza en el cromosoma 8 (8p12). Este gen codifica el activador del plasminógeno de tipo tisular, una serina proteasa secretada que convierte el plasminógeno proenzimático en plasmina, una enzima fibrinolítica. El activador del plasminógeno de tipo tisular se sintetiza como una cadena sencilla que se escinde por plasmina para dar una proteína unida por disulfuro de dos cadenas. Esta enzima desempeña un papel en la migración celular y la remodelación tisular. El corte y empalme alternativo de este gen da como resultado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. (Número de registro de Genbank NP_127509.1, NM_033011.2).

20 En el contexto de la presente invención, el término "*inhibidor 1 del activador del plasminógeno*" (de aquí en adelante denominado PAI-1) también conocido como inhibidor del activador del plasminógeno endotelial o serpina E1 es una proteína que en humanos se codifica por el gen *SERPINE1*. PAI-1 es un inhibidor de serina proteasa (serpina) que actúa como inhibidor principal del activador del plasminógeno tisular (tPA) y la urocinasa (uPA), los activadores del plasminógeno y, por tanto, la fibrinólisis (la descomposición fisiológica de coágulos de sangre). Es una proteína inhibidora de serina proteasa (serpina) (*SERPINE1*).

25 En el contexto de la presente invención, un "episodio trombótico" se define como la formación o presencia de un coágulo de sangre en un vaso sanguíneo. El vaso puede ser cualquier vena o arteria como, por ejemplo, en una trombosis venosa profunda o una trombosis (arterial) coronaria. El coágulo en sí se denomina trombo. Si el coágulo se depende y desplaza a través del torrente sanguíneo, es una tromboembolia. Trombosis, trombo y el prefijo trombo- vienen del griego *thrombos* que significa un bulto o masa, o una cuajada o coágulo de leche.

30 En el contexto de la presente invención, la inflamación es la ruta común final de diversos ataques, tales como infección, traumatismo y alergias, al cuerpo humano. Se caracteriza por la activación del sistema inmunitario con reclutamiento de células inflamatorias, producción de células proinflamatorias y producción de citocinas proinflamatorias. La mayoría de las enfermedades y trastornos inflamatorios se caracterizan por la acumulación anómala de células inflamatorias, incluyendo monocitos/macrófagos, granulocitos, células plasmáticas, linfocitos y plaquetas. Junto con células endoteliales tisulares y fibroblastos, estas células inflamatorias liberan una matriz compleja de lípidos, factores del crecimiento, citocinas y enzimas destructivas que producen daño tisular local.

40 Las enfermedades inflamatorias abarcadas por los métodos de esta invención pueden derivarse de una amplia variedad de afecciones que producen inflamación. Inflamación se refiere a todas las fases del proceso de inflamación, incluyendo los episodios de señalización iniciales, presentación de antígenos, activación de células dendríticas, producción de anticuerpos, activación de linfocitos T, activación de linfocitos B y expresión de citocinas. Uno de los tipos de enfermedades inflamatorias son enfermedades inmunoinflamatorias. Los ejemplos de enfermedades inmunoinflamatorias incluyen afecciones tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, rechazo de trasplante, septicemia, síndrome de dificultad respiratoria aguda, asma y cáncer. Otro tipo de enfermedad inflamatoria son enfermedades autoinmunitarias. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen afecciones tales como esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, glomerulonefritis, lupus, uveítis y hepatitis crónica. Otras enfermedades inflamatorias, incluyendo tales afecciones provocadas por traumatismo, estrés oxidativo, muerte celular, daño por irradiación, isquemia, reperfusión, cáncer, rechazo de trasplante e infección vírica, pueden ser objeto de la presente invención.

55 Enfermedades inflamatorias de las arterias también pueden provocar enfermedad vascular periférica, en las que, en una realización preferida de la presente invención, la enfermedad inflamatoria es la enfermedad vascular periférica.

Los factores de riesgo más frecuentes para el desarrollo de enfermedad vascular periférica son diabetes *mellitus*, hipertensión y tabaquismo, así como antecedentes familiares de hiperlipidemia. Hay dos amplias categorías en las que se presentan los pacientes con enfermedad vascular periférica.

60 En el contexto de la presente invención, isquemia crítica de las extremidades inferiores (CLI) es un bloqueo grave en las arterias de las extremidades inferiores, que reduce marcadamente el flujo sanguíneo. Es una forma grave de enfermedad arterial periférica. La CLI es una afección crónica que da como resultado dolor intenso en los pies o los dedos de los pies, incluso en reposo. Las complicaciones de una mala circulación pueden incluir llagas y heridas que no cicatrizarán en las piernas y los pies. Si se dejan sin tratar, las complicaciones de la CLI darán como resultado la amputación de la extremidad afectada.

En una realización preferida de la presente invención, la enfermedad inflamatoria es la isquemia crítica de las extremidades inferiores (CLI).

En el contexto de la presente invención, el término “células mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo” o “AdMSC”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células que se originan de tejido adiposo y se caracterizan fenotípicamente porque son (i) negativas para al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o preferiblemente todos de los siguientes marcadores CD3, CD1b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD62L, CD95L, CD117, y marcadores de la superficie celular HLA-DR, y (ii) positivas para al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o preferiblemente todos los siguientes marcadores CD13, CD29, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD166, y marcadores de la superficie celular HLA-ABC. Por “tejido adiposo” quiere decirse cualquier tejido de grasa. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo pardo o blanco, derivado de un sitio de tejido adiposo subcutáneo, epiploico/visceral, mamario, gonadal u otro, por ejemplo, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratar”, “tratamiento” y “que trata” se refieren a la mejora, cura o remedio de una enfermedad inflamatoria, que resulta de la administración de la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención que comprende una población de MSC a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombotico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, que comprende pero no se limita a diabetes tipo 2, enfermedad vascular periférica (PVD) y/o isquemia crítica de las extremidades inferiores, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

(a) obtener una muestra de MSC aisladas, particularmente MSC de tejido adiposo,

(b) poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,

(c) usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, en la muestra biológica obtenida en la etapa b,

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, expresión aumentada se define como un nivel de expresión mayor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales. En una realización más preferida de la invención, aumentado se define como un nivel de expresión mayor que o igual a dos veces, particularmente mayor de tres veces, la expresión de proteína tPA o ARNm que codifica el tPA, en MSC en condiciones de cultivo normales. Obsérvese que la expresión de proteína tPA en condiciones de cultivo normales se entiende que es de desde 2 hasta 3 ng/ml.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombotico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, que comprende pero no se limita a diabetes tipo 2, enfermedad vascular periférica (PVD) y/o isquemia crítica de las extremidades inferiores, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

(a) obtener una muestra de MSC aisladas, particularmente MSC de tejido adiposo,

(b) poner en contacto las AdMSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,

(c) usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida en la etapa b,

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de PAI-1, o ARN que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales. En una realización más preferida de la invención, expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que o igual a 1/2, particularmente menor que o igual a 1/3, de la expresión de proteína PAI-1 o ARNm que codifica el PAI-1, en MSC en condiciones de cultivo normales. Obsérvese que la expresión de proteína PAI-1 en condiciones de cultivo normales se entiende que es de desde 150 hasta 200 ng/ml.

En el contexto de la presente invención, los sujetos cuya respuesta se predice son sujetos humanos que padecen una enfermedad inflamatoria. Los términos “sujeto humano” “sujeto” y “paciente” se usan, por tanto, indistintamente en esta memoria descriptiva.

5 En el contexto de la presente invención, “respuesta” se refiere al desenlace clínico del sujeto. En este sentido, una respuesta positiva se refiere a la progresión libre de un sujeto de padecer un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria después de que dicho sujeto se haya sometido a tratamiento.

10 En el contexto de la presente invención, el método de determinación de la respuesta, es decir, el nivel de expresión del ARNm de tPA o PAI-1, no necesita estar particularmente limitado, y puede seleccionarse de un método de obtención del perfil genético, tal como una micromatriz, y/o un método que comprende PCR, tal como PCR en tiempo real; y/o transferencia de tipo Northern o usando inmunohistoquímica.

15 La PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) es una técnica de cuantificación de la expresión génica reproducible y sensible que puede usarse particularmente para obtener el perfil de expresión de ARNm en células y tejidos. Puede usarse cualquier método para la evaluación de resultados de RT-PCR, y puede preferirse el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak *et al.* Methods 2001, 25:402-408.) (Ct = valores umbrales de ciclo). El método de $\Delta\Delta Ct$ implicará una muestra de control y una muestra de tratamiento. Para cada muestra, se incluyen un gen diana y un control endógeno (tal como se describe a continuación) para la amplificación por PCR a partir de alícuotas (normalmente diluidas en serie). Normalmente, se usan varias réplicas para cada concentración diluida para derivar eficacia de amplificación. La eficacia de amplificación por PCR puede definirse como el porcentaje de amplificación (desde 0 hasta 1). Durante la reacción de PPCR, un software mide normalmente para cada muestra el número de ciclos en el que la fluorescencia (indicador de amplificación por PCR) cruza una línea arbitraria, el umbral. Este punto de cruce es el valor de Ct. Muestras más diluidas cruzarán a valores de Ct más tardíos. Para cuantificar la expresión génica de ARNm, el Ct para un ARN o ADN a partir del gen de interés de ARNm se divide entre el Ct de ácido nucleico del control endógeno, tal como tejido no tumoral, para normalizar la variación en la cantidad y calidad de ARN entre diferentes muestras. Este procedimiento de normalización se denomina comúnmente método de $\Delta\Delta Ct$ (Scheffe *et al.*, 2006, J. Mol. Med. 84: 901-10). Los cálculos de $\Delta\Delta Ct$ expresan datos en el contexto de la muestra problema (en este caso: ARNm) frente a calibrador (control endógeno). Si el cálculo de $\Delta\Delta Ct$ es positivo (por ejemplo, +2,0), entonces: $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2 - (2,0) = 0,25$. La cantidad de diana, normalizada con respecto a una referencia endógena y en relación con un calibrador, viene dada por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Pueden encontrarse los detalles del método de cálculo de $\Delta\Delta Ct$ en: Applied Biosystems user Bulletin n.º 2 (P/N 4303859).

35 Sin perjuicio del método usado para determinar la respuesta (RQ-PCR, inmunohistoquímica, etc.), en el contexto de la presente invención una expresión aumentada o una expresión reducida se definen en comparación con una muestra normal/muestra de referencia y/o con un control positivo.

40 En este sentido, una “muestra normal” o una “muestra de referencia” se define como una muestra que expresa proteínas tPA y/o PAI-1 o ARNm que codifica cualquiera de estas proteínas, es decir, una muestra que se origina del mismo tejido de la biopsia de origen (en este caso AdMSC aisladas de tejido adiposo de sujetos humanos, la muestra de control sería de sujetos humanos sin una enfermedad inflamatoria).

45 En el contexto de la presente invención, una muestra de control positivo son cultivos humanos normales de MSC.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:

- 50
- (a) obtener una muestra de MSC aisladas, particularmente MSC de tejido adiposo,
 - (b) poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,
 - 55 (c) usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, y proteína del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida en la etapa b;

60 en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo y si los niveles de expresión de PAI-1, o ARNm que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.

65 En una realización preferida según uno cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, el sujeto humano

padece diabetes tipo 2. En una realización más preferida de la invención, el sujeto humano padece enfermedad vascular periférica (PVD). En una realización todavía más preferida de la presente invención, el sujeto humano padece isquemia crítica de las extremidades inferiores (CLI).

5 Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método para asignar un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria a uno de dos grupos, en el que grupo 1 comprende sujetos identificables mediante el método según los aspectos segundo, tercero o cuarto de la invención como sujetos humanos con respuesta positiva; y en el que el grupo 2 representa los sujetos restantes.

10 En un aspecto particular de la invención, un sujeto humano con riesgo elevado de padecer un episodio trombótico del grupo 2, tal como resulta identificable mediante el método del quinto aspecto de la invención, puede ser apto para un cambio de tratamiento. El tratamiento de elección depende de muchos factores diferentes tales como el tipo de enfermedad inflamatoria. También se divulga una composición farmacéutica que comprende MSC y/u otro compuesto para tratar a un sujeto humano del grupo 1 tal como resulta identificable mediante el método del quinto aspecto de la invención.

15 En una realización preferida, la composición farmacéutica para el tratamiento de elección de un sujeto humano del grupo 1 que padece una enfermedad inflamatoria, tal como resulta identificable mediante el método del quinto aspecto de la invención, comprende MSC aisladas. En una realización más preferida de la invención, las MSC son MSC autólogas humanas. En una realización todavía más preferida de la presente invención, las MSC son MSC cultivadas derivadas de médula ósea autólogas o células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo (AdMSC).

20 En el contexto de la presente invención, el término “aislado” aplicado a una población celular se refiere a una población celular, aislada del cuerpo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más poblaciones celulares que están asociadas con dicha población celular *in vivo* o *in vitro*.

25 La composición farmacéutica divulgada en el presente documento es una composición farmacéutica que contiene células que comprende MSC. Esta composición que contiene células no está particularmente limitada en cuanto a otras disposiciones tales como disposición de composición (líquido de tampón, líquido de cultivo o similares), número de células, etc. Además, la composición farmacéutica que contiene células según la presente invención contiene preferiblemente secreciones (por ejemplo, factor de crecimiento o similares) secretadas de células contenidas en la composición farmacéutica que contiene células.

30 La composición que contiene células puede usarse como fármaco (composición farmacéutica) para medicina regenerativa. Es decir, un fármaco según la presente invención para medicina regenerativa no está particularmente limitado en cuanto a otras disposiciones específicas, siempre que comprenda la composición que contiene células. Por ejemplo, el uso del fármaco puede ser tal que las MSC indiferenciadas se diferencian en células de un tipo adecuado para el uso, y después se usan. Más específicamente, esto puede llevarse a cabo de manera tal que las MSC se diferencian usando un material que induce la diferenciación tal como una citocina o similares, y luego las células diferenciadas se administran a un paciente que va a tratarse con la medicina regenerativa. Por tanto, en una realización preferida la presente invención abarca fármacos para medicina regenerativa que contienen una composición de células obtenida mediante diferenciación de las células madre mesenquimatosas indiferenciadas, aparte de los fármacos que contienen las células madre mesenquimatosas indiferenciadas.

35 Además, las condiciones de administración del fármaco para medicina regenerativa en aplicaciones clínicas reales pueden determinarse según sea apropiado mediante experimentos con animales o similares realizados como métodos convencionales en este campo. Es decir, las condiciones adecuadas para la prevención o los efectos terapéuticos pueden determinarse por medio de experimentos con animales para estudiar las condiciones de administración tales como dosificación, intervalos de administración, vías de administración, etc. El fármaco para medicina regenerativa puede utilizarse como fármaco para “medicina regenerativa mediante trasplante celular” que regenera un tejido perdido por una enfermedad o afectación y reanuda una función, tejido que no puede regenerarse mediante un método terapéutico convencional.

40 El fármaco para medicina regenerativa no está limitado al tratamiento de una enfermedad, síntoma, perfil clínico particular o similares, siempre que el fármaco se use para propósitos de “medicina regenerativa mediante trasplante celular”. Los ejemplos más específicos del fármaco para medicina regenerativa incluyen trasplante de células madre mesenquimatosas de médula ósea a un paciente con isquemia crítica de las extremidades inferiores, trasplante de células madre mesenquimatosas de médula ósea a un paciente con una enfermedad periodontal, trasplante de células madre mesenquimatosas de médula ósea a un paciente con osteoartritis, a un paciente de diabetes *mellitus*, y el otro trasplante. El fármaco para medicina regenerativa puede usarse como composición mediante mezclado con un vehículo farmacéuticamente admisible. Ejemplos del vehículo abarcan agua esterilizada, solución fisiológica, tampones, aceite vegetal, emulsionantes, agentes de suspensión, sales, estabilizantes, conservantes, tensioactivos, controladores de la liberación, otras proteínas (BSA, etc.), reactivos de transfección (que abarcan reactivos de lipofección, liposomas y similares) y similares. Además, los siguientes vehículos son aplicables en la presente invención: matrices extracelulares tales como glucosa, lactosa, goma arábiga, gelatina, manitol, pasta de almidón,

trilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, ácido hialurónico, colágeno, etc.; polilactosa, vehículo de fosfato de calcio, etc.

5 El fármaco puede tener cualquier forma. Por ejemplo, el fármaco puede tener formas de disolución (tipo inyección),
microcápsula, comprimido y similares. El fármaco puede administrarse sistémica o localmente. La administración
local es preferible si la administración sistémica presenta efectos secundarios o no es tan eficaz como la
administración local. Además, el fármaco puede administrarse a un paciente en cualquier forma y la administración
puede ser, por ejemplo, quirúrgica, percutánea, transbronquial, muscular, interperitoneal, intravenosa, intraarterial,
10 intraarticular, subdérmica, medular, intracerebroventricular u oral. El fármaco puede administrarse sistémica o
localmente. La administración local a la sección de lesión es preferible si la administración sistémica presenta
efectos secundarios. La dosificación y el modo de administración pueden variarse según el peso, la edad y los
síntomas del paciente, propósitos terapéuticos y movilidad tisular de los constituyentes activos del fármaco, y los
demás factores. Un experto en la técnica puede seleccionar de manera arbitraria la dosificación y el modo de
15 administración. También se divulga un kit adecuado para poner en práctica el método de la invención, que
comprende al menos un(os) oligonucleótido(s) capaz/capaces de hibridar con los ARNm de o bien tPA y/o bien PAI-
1.

20 El kit se basa en el poder de pronóstico del método de la presente invención. En el caso particular del kit, puede
proporcionarse el valor de referencia indicativo de ausencia de respuesta (y/o un valor de referencia indicativo de
respuesta) con el kit. Con la ayuda del kit, puede calcularse la expresión de cada ARNm diana, es decir en relación
con, tal como las muestras de control endógenas ejemplificadas anteriormente. Por tanto, el control endógeno puede
estar comprendido dentro del kit.

25 Se prefiere que dicho(s) oligonucleótido(s) hibride(n) con dos apareamientos erróneos o menos, y preferiblemente
con ningún apareamiento erróneo, con respecto al ARNm que va a determinarse. En lo que se refiere a la
hibridación del/de los oligonucleótido(s), se prefiere que dicho(s) oligonucleótido(s) sea(n) capaz/capaces de
realizarla en condiciones rigurosas. La rigurosidad es un término usado en experimentos de hibridación. La
rigurosidad refleja el grado de complementariedad entre el oligonucleótido y el ácido nucleico (que es, en este caso,
30 el ARNm que va a detectarse); cuanto mayor sea la rigurosidad, mayor es el porcentaje de homología entre la sonda
y el ácido nucleico unido al filtro. Un experto sabe bien que la temperatura y las concentraciones de sal tienen un
efecto directo en los resultados que se obtienen. Se reconoce que los resultados de hibridación están relacionados
con el número de grados por debajo de la T_m (temperatura de fusión) del ADN a la que se realiza el experimento. A
menudo, las condiciones rigurosas se definen como un lavado con 0,1X SSC (tampón de solución salina-citrato de
35 sodio (SSC) a 65 °C. (SSC se proporciona normalmente como disolución madre 20X, que consiste en cloruro de
sodio 3 M y citrato de trisodio 300 mM (ajustada a pH 7,0 con HCl)).

40 En realizaciones particulares, el kit se selecciona de (a) un kit adecuado para PCR, (b) un kit adecuado para
transferencia de tipo Northern y (c) un kit adecuado para análisis de micromatrices. También pueden combinarse
dos o más de estas realizaciones cualesquiera, de manera que el kit puede comprender, por ejemplo tanto (a) como
(c).

Con respecto a (a) un kit adecuado para PCR, esta PCR es normalmente PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR), una técnica de cuantificación de la expresión génica sensible y reproducible.

45 Una transferencia de tipo Northern implica el uso de electroforesis para separar muestras de ARN por tamaño y
posterior detección con un(os) oligonucleótido(s) (sonda de hibridación) complementario(s) a (parte de) la secuencia
diana del ARN de interés.

50 También es posible que el/los oligonucleótido(s) se inmovilice(n) en puntos sobre una superficie (preferiblemente
sólida). En una realización del mismo, el kit comprende una micromatriz. Una micromatriz de ARN es una matriz
sobre un sustrato sólido (habitualmente un portaobjetos de vidrio o célula de película fina de silicio) que somete a
ensayo grandes cantidades de diferentes ARN que son detectables por medio de sondas específicas inmovilizadas
sobre puntos en el sustrato sólido. Cada punto contiene una secuencia de ácido nucleico específica, normalmente
55 una secuencia de ADN, conocida como sondas (o indicadores). Aunque el número de puntos no está limitado como
tal, hay una realización preferida en la que la micromatriz se personaliza para los métodos de la invención. En una
realización, una micromatriz personalizada de este tipo comprende cincuenta puntos o menos, tal como treinta
puntos o menos, incluyendo veinte puntos o menos.

60 Una realización adicional se refiere a un kit adecuado para detectar el nivel de expresión de tPA y/o PAI-1 que
comprende un medio que tiene fijado al mismo un anticuerpo de captura capaz de complejarse con cualquiera de las
proteínas biomarcadoras tPA o PAI-1 o un fragmento de las mismas y un ensayo para la detección de un complejo
del biomarcador y el anticuerpo de captura.

65 Como con el kit anterior, este kit se basa en el poder de pronóstico del método de la presente invención. En el caso
particular del kit, puede proporcionarse el valor de referencia indicativo para la ausencia de respuesta (y/o un valor
de referencia indicativo para respuesta) con el kit. Con la ayuda del kit, la expresión de cada ARNm diana puede

calcularse, es decir en relación con, tal como las muestras de control endógenas ejemplificadas anteriormente. El control endógeno puede, por tanto, estar comprendido también dentro del kit.

5 El kit puede usarse y el uso no está particularmente limitado, aunque se prefiere el uso en el método de la invención en cualquiera de sus realizaciones.

10 Un experto en la técnica aprecia rápidamente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a la misma. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de realizaciones preferidas, son a modo de ejemplo y no están previstos como limitaciones en el alcance de la invención.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de esas habilidades ordinarias en la técnica a la que pertenece la invención.

15 La invención descrita de manera ilustrativa en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se divulgue específicamente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pueden reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de tales términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por tanto, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificación y variación de los conceptos divulgados en el presente documento, y que tales modificaciones y variaciones se encuentran dentro del alcance de esta invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

20 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención; no se pretende de ningún modo que estos ejemplos limiten el alcance de la invención.

30 **Ejemplos**

Materiales y métodos

35 *Muestras*

Se obtuvieron tejido adiposo abdominal y sangre de pacientes diabéticos y no diabéticos incluidos en dos ensayos clínicos ([EudraCT: 2008-001387-88](#) y [EudraCT: 2009-013554-32](#)). Los donantes proporcionaron su consentimiento informado, y los comités de ética de investigación médica locales y regionales aprobaron la manipulación de estas muestras.

Cultivo celular

45 Se aislaron AdMSC de tejido adiposo de pacientes diabéticos y no diabéticos con CLI mediante digestión con colagenasa A. Brevemente, se lavó muestra de tejido con PBS, se homogeneizó con Ika Ultra Turrax Drive y se digirió con colagenasa A durante dos horas y media a 37 °C. Se detuvo la digestión con medio de expansión (DMEM complementado con FBS al 10 %, penicilina/estreptomicina al 1 %, L-glutamina al 1 %). Tras la centrifugación, se filtró la fase semisólida con un filtro celular de 100 μm , se mezcló con el sedimento de células y se lavó con PBS. Se contaron las células en una cámara Neubauer y se sembraron a $1,2\text{-}2,0 \times 10^4$ células/cm². Tras 24 h, se cambió el medio para eliminar por lavado cualquier célula no adherente. Se obtuvieron AdMSC de control de la ATCC (ATCC-PCS-500-011). Se expandieron las AdMSC y se mantuvieron en medio basal de células madre mesenquimatosas (MSCBM - Lonza) complementado con complementos de crecimiento (GS: MSCGM™ SingleQuots®, Lonza) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada del 20 % de O₂ y el 5 % de CO₂. Cuando se alcanzó el 80-90 % de confluencia, se tripsinizaron las AdMSC y volvieron a sembrarse en una densidad de 5×10^3 células/cm² para lograr una proliferación óptima.

55 Se caracterizaron las AdMSC mediante los siguientes marcadores específicos: CD13, CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD90, HLA-II y CD105 y mediante el potencial de diferenciación tras la expansión celular. El medio para inducción adipogénica usado fue medio de inducción adipogénica (Lonza), complementado con h-insulina (recombinante), L-glutamina, complemento de crecimiento de células mesenquimatosas (MCGS), GA-1000, dexametasona, indometacina e IBMX (Lonza). Después de 3 ciclos de inducción/mantenimiento, se fijaron las células con formol al 10 % y se tiñeron con disolución de aceite rojo O (Sigma). El medio de inducción osteogénica consistía en medio basal osteogénico (Lonza) complementado con dexametasona, ascorbato, MCGS, L-glutamina, penicilina/estreptomicina, β -glicerofosfato (Lonza). Tras dos semanas en medio de diferenciación, se fijaron las células y se tiñeron con rojo alizarina (Sigma).

Muestras de sangre

Se obtuvo suero sanguíneo humano mediante centrifugación de sangre humana de pacientes diabéticos y no diabéticos con CLI, y también de donantes voluntarios sanos. Se tomaron alícuotas del suero y se congelaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Configuraciones experimentales

Se sembraron AdMSC en placas de cultivo a 5×10^4 células/cm² en MSCBM (Lonza) complementado con MSCGM™ SingleQuots® (Lonza) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada del 20 % de O₂ y el 5 % de CO₂ durante 24 h. Las 24 h siguientes, se cultivaron las MSC con MSCBM libre de suero y al día siguiente con MSCBM complementado con complementos de crecimiento (GS: MSCGM™ Single Quots®, Lonza) o sueros de sangre humana. Tras 24 h, se recogieron los sobrenadantes, se tomaron alícuotas y se congelaron para su análisis posterior, y se lavaron las células con PBS dos veces antes de su recogida.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total de las AdMSC usando Trizol® según las instrucciones del fabricante y se midió la concentración de ARN espectrofotométricamente (Nanodrop). Se digirió el ADN genómico restante con ADNasa libre de ARNasa RQ1 de páncreas bovino (Promega) mediante incubación a 37 °C durante 30 minutos. Se llevó a cabo transcripción inversa con 2 µg de ARN total usando transcriptasa inversa M-MLV (Promega) según las instrucciones del fabricante.

qRT-PCR

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos usando el software Primer Express versión 3.0 (Applied Biosystems). Se seleccionó cada par de cebadores de manera que el amplicón abarcara una unión de exones para impedir la amplificación del posible ADN genómico. Los cebadores usados para amplificar el transcrito de PAI-1 fueron: directo (5'-CTC TCT CTg CTG CCC TCA CCA AC-3') e inverso (5'-gTg GTG gAg GAG Agg AGG CTC TTg TTG gTC GTC TgTG-3') y para tPA fueron: directo (5'-CAA gTC GTC TCC TTC CCC TTT CC-3') e inverso (5'-ggg GGG TTg TTG Tgg TGG CAA CAg CAG AAA gTGT-3'). Se seleccionaron ciclofilina A (PPIA, tataabiocenter) y proteína ribosómica ácida 60S P0 (RPLP, tataabiocenter) como controles endógenos para corregir la posible variación en la carga de ARN o las eficacias de la reacción de transcripción inversa o amplificación.

Para cuantificación relativa, se amplificaron secuencias de ADNc usando el ensayo de C_T comparativo (Applied Biosystems). Para este fin, se sometieron a ensayo 10 µl de SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix (que incluye polimerasa, dNTP y tampón) (Bioline), 0,8 µl de cebador directo (400 nM), 0,8 µl de cebador inverso (400 nM), 10 ng de ADNc y H₂O hasta 20 µl de reacción de volumen final en un sistema de PCR en tiempo real en placas de RQ (Applied Biosystems). Las condiciones de ciclado térmico fueron 2 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos de PCR de 2 etapas que consistían en 5 segundos a 95 °C y 25 segundos a temperatura de apareamiento (60 °C para PAI-1 y 64 °C para tPA). Se amplificaron todas las muestras por triplicado.

ELISA

Para la detección de las proteínas PAI-1 y tPA, se realizó ELISA. Se transfirieron sobrenadantes de AdMSC estimuladas o no con complemento de crecimiento o suero sanguíneo humano a placas para ELISA previamente recubiertas (Bender MedSystems) y se detectaron las proteínas según las instrucciones del fabricante.

Cultivo en gel de fibrina

Se produjeron geles de fibrina que contenían AdMSC tal como sigue: se vertieron 20 µl de trombina (10 unidades/ml; Sigma) en una placa de cultivo celular de 24 pocillos, y se añadieron 180 µl de suspensión de fibrinógeno-células. Esta suspensión consistía en 50 µl de CaCl₂ (50 mM; Sigma), 20 µl de PBS, 830 µl de fibrinógeno (20 mg/ml; Sigma) y 100 µl de suspensión celular ($7,5 \times 10^6$ células/ml). Para controles negativos, se reemplazó la suspensión celular por medio de cultivo. Tras 15 min de polimerización, se añadió 1 ml de medio de cultivo libre de suero (MSCBM) en ausencia o presencia de suero (GS) o sueros de sangre humana (hBS, hBS-D, hBS-ND) a los geles de fibrina coagulados. Se cultivaron las células en una atmósfera humidificada del 20 % de O₂ y el 5 % de CO₂ a 37 °C. Tras 24 h, se retiró el medio para la detección de dímero D, mientras los geles se fijaron en formol para análisis histológico.

Análisis histológico

Se fijaron en formol geles que contenían AdMSC durante aproximadamente 24 h, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 2 µm de grosor y se transfirieron a portaobjetos de microscopio, se descercaron, se aclararon en agua destilada y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Análisis de agregados celulares

5 Se usó software gratuito de análisis de imágenes (Image J) para cuantificar que el número de imágenes de células libres y agregadas son de 4 imágenes arbitrarias/portaobjetos/condición.

Detección de dímero D

10 Se detectaron productos de degradación de coágulos de fibrina tras el cultivo del constructo de células-fibrina (dímeros D) siguiendo las instrucciones del fabricante para el kit Blue D-Dimer (Teco). El ensayo contiene partículas de látex recubiertas con anticuerpo. En presencia de dímero D, las partículas se agregan dando agregados mayores y la dispersión de la luz disminuye. La medida de la absorbancia es proporcional a la cantidad de dímero D en la muestra.

15 *Análisis estadístico*

Se procesaron los resultados para análisis estadístico con el paquete SPSS para Windows (SPSS, Chicago, IL). A menos que se establezca lo contrario, los datos se representan como valores medios \pm EEM. Se analizaron los datos con pruebas ANOVA unilaterales y bilaterales. Se usó la prueba de Tukey para comparaciones. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

25 Las AdMSC expandidas fueron positivas para CD13, CD90, CD105, CD73 (marcadores mesenquimatosos) (figura 1 a,b,c,d) y CD29 (marcador de adhesión) (figura 1e), mientras que fueron negativas para CD34, CD45 (marcadores de células hematopoyéticas) (figura 1f,g), CD31 (marcador de células endoteliales) (figura 1h), y HLA-DR (antígeno de diferenciación de leucocitos humanos de clase II) (figura 1i). Para demostrar la multipotencia de MSC aisladas, se diferenciaron células en adipocitos y osteoblastos. Tras la inducción adipogénica y osteogénica, las vacuolas lipídicas de los adipocitos se visualizaron con aceite rojo O (figura 1k) y la matriz mineralizada que rodeaba los osteoblastos con rojo de alizarina (figura 1l). Las MSC no tratadas mostraron tinción negativa tanto para aceite rojo O como para rojo de alizarina y presentaron una morfología en forma de huso (figura 1j).

35 Se evaluó la expresión y liberación de componentes clave de la cascada fibrinolítica (tPA, PAI-1) tras la estimulación de AdMSC de control, AdMSC de pacientes diabéticos con CLI (AdMSC-D), y pacientes no diabéticos con CLI (AdMSC-ND) con suero sanguíneo de control sano (hBS), pacientes diabéticos con CLI (hBS-D) y pacientes no diabéticos con CLI (hBS-ND) tal como se describió en los métodos. Después de eso, se recogieron los sobrenadantes para ELISA y se recogieron las células para extraer ARN. Puesto que PAI-1 tiene un periodo corto de actividad en el plazo de 0.5-2 horas en condiciones fisiológicas¹⁶, se llevaron a cabo experimentos de transcurso temporal para comprobar la estabilidad de la proteína secretada por AdMSC en los sobrenadantes tras la estimulación con suero diferente; se detectó la concentración cuantificada óptima 24 h después de la estimulación para todas las condiciones sometidas a ensayo (datos no mostrados). La figura 2 muestra la expresión de ARNm de tPA (a) y proteína (b) después de los estímulos de AdMSC con GS (Control DESCRIBE), hBS, hBS-D y hBS-ND.

45 Las AdMSC expresan y liberan de manera similar tPA en condiciones de cultivo normales (figura 2a, b). Cuando se estimularon las células con hBS (suero de sangre humana) se observó que, mientras que para AdMSC y AdMSC-ND (no diabético) la expresión de tPA se mejoró 3.8 y 3.1 veces, respectivamente, para AdMSC-D (diabético) la expresión observada fue similar a las células no estimuladas (figura 2a); los niveles de proteína mostraron los mismos resultados (figura 2b). Por tanto, hBS reguló por incremento la expresión de tPA en el control y las AdMSC-ND y no estimuló la expresión de este gen en AdMSC-D. Los resultados observados tras la estimulación con hBS-D mostraron una mejora de 4 veces en la expresión de tPA de las AdMSC-ND, mientras que el control y las AdMSC-D no se modificaron (figura 2a). Los niveles de proteína mostraron una expresión menor de tPA en AdMSC-D, mientras que las AdMSC expresaron niveles muy similares a los observados tras GS (control) y estimulación con hBS (figura 2b). La estimulación con hBS-ND proporcionó resultados muy similares en comparación con el ensayo de estimulación con hBS. Así que, para todas las condiciones sometidas a ensayo, las AdMSC-D mostraron una expresión menor de tPA en comparación con las AdMSC y AdMSC-ND; además, se observó que la liberación estimulada de tPA a partir de AdMSC-D fue siempre inferior a la de AdMSC y AdMSC-ND.

60 Las AdMSC expresan PAI-1 en condiciones de cultivo de control, aunque las AdMSC-ND expresaban niveles menores (figura 3). Tras la estimulación con hBS, la expresión de PAI-1 fue similar a la del control a niveles de ARNm (figura 3a), mientras que los niveles de proteína presentaron un aumento en la concentración de PAI-1 para todas las MSC sometidas a ensayo en comparación con el control (figura 3b). En MSC de pacientes diabéticos AdMSC-D, la expresión de PAI-1 a niveles de ARNm fue mayor tras la estimulación con hBS-D y hBS-ND (figura 3a); los niveles de proteína fueron similares para AdMSC y AdMSC-ND tras la estimulación con hBS, mientras que las AdMSC-D mostraron una mejora de 2 veces en comparación con el ensayo de hBS (figura 3b). La respuesta observada tras la estimulación con hBS-ND fue muy similar a la de hBS-D, aunque los niveles fueron ligeramente menores (figura 3). Para todas las condiciones sometidas a ensayo, las AdMSC-D mostraron una expresión mayor

de PAI-1, a niveles de ARNm y proteína, y siempre mayor tras la estimulación con hBS-D.

5 Finalmente, incluimos AdMSC en coágulos de fibrina para imitar una situación fibrinolítica *ex vivo*. Tras 24 h, se observó degradación continua de los coágulos de fibrina, según el aumento en el diámetro de la zona de aclaramiento que rodeaba las células, excepto para AdMSC-D (figura 4a) que mostró notablemente una forma diferente que consistía en menos células aisladas (figura 4b) y elevado número de células agregadas por área (figura 4c). Para cuantificar la actividad fibrinolítica de estas células, recogimos los sobrenadantes de los constructos de fibrina-células y se midieron los dímeros D, los productos de degradación de fibrina; tal como se muestra en la figura 4d, todas las AdMSC usadas fueron altamente activas en la escisión de fibrina en condiciones de control, tal como se muestra por la presencia de dímeros D en los sobrenadantes de cultivo. Para todas las condiciones sometidas a ensayo, las AdMSC degradaron más fibrina que las demás células usadas; además, observamos una concentración de dímero D menor cuando las AdMSC se estimularon con hBS-D. El patrón observado para AdMSC-ND fue muy similar al de AdMSC, excepto cuando estas células se estimulan con hBS-D donde la concentración de dímero D fue menor. De manera interesante, las AdMSC-D mostraron siempre la menor concentración de dímeros D, independientemente del hBS sometido a ensayo, y no pudieron degradar los coágulos de fibrina.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Uso del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y/o inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), para pronosticar o predecir *in vitro* un episodio trombótico asociado con el tratamiento con células madre mesenquimatosas (MSC) de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria.
 - a. obtener MSC aisladas a partir de una muestra;
 - b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,
 - c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.
2. Método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:
 - a. obtener MSC aisladas a partir de una muestra,
 - b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,
 - c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.
3. Método según la reivindicación 3, en el que expresión aumentada se define como un nivel de expresión mayor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales.
4. Método según la reivindicación 3, en el que aumentado se define como un nivel de expresión mayor que o igual a dos veces la expresión de proteína tPA o ARNm que codifica el tPA en MSC en condiciones de cultivo normales.
5. Método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:
 - a. obtener MSC aisladas a partir de una muestra,
 - b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,
 - c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b),

en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de PAI-1, o ARNm que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.
6. Método según la reivindicación 5, en el que expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales.
7. Método según la reivindicación 5, en el que expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que o igual a 1/2, de la expresión de proteína PAI-1 o ARNm que codifica el PAI-1, en MSC en condiciones de cultivo normales.
8. Método para pronosticar o predecir un episodio trombótico asociado con el tratamiento con MSC de un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria, prediciendo o pronosticando la respuesta de dicho sujeto humano a dicho tratamiento, en el que dicho método comprende:
 - a. obtener MSC aisladas a partir de una muestra,
 - b. poner en contacto las MSC aisladas de la etapa (a) con suero sanguíneo humano obtenido mediante centrifugación de sangre humana del sujeto humano,
 - c. usar, como indicador, los niveles de expresión de proteína del activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de ARNm que codifica el tPA, y proteína del inhibidor del activador del

plasminógeno (PAI-1), o ARNm que codifica el PAI-1, en la muestra biológica obtenida de la etapa (b);

- 5 en el que el resultado es indicativo de una respuesta positiva si los niveles de expresión de proteína tPA, o de ARNm que codifica el tPA, en dicha muestra biológica están aumentados en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo y si los niveles de expresión de PAI-1, o ARNm que codifica el PAI-1, están disminuidos en comparación con una muestra de referencia y/o un control positivo.
- 10 9. Método según la reivindicación 8, en el que expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales y en el que expresión aumentada se define como un nivel de expresión superior a la expresión producida en una muestra de referencia, preferiblemente MSC en una muestra en condiciones de cultivo normales.
- 15 10. Método según la reivindicación 8, en el que expresión disminuida se define como un nivel de expresión menor que o igual a 1/2, de la expresión de proteína PAI-1 o ARNm que codifica el PAI-1, en MSC en condiciones de cultivo normales y en el que expresión aumentada se define como un nivel de expresión mayor que o igual a dos veces la expresión de proteína tPA o ARNm que codifica el tPA en MSC en condiciones de cultivo normales.
- 20 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la enfermedad inflamatoria es la diabetes tipo 2.
- 25 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la enfermedad inflamatoria es enfermedad vascular periférica.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad vascular periférica es una isquemia crítica de las extremidades inferiores.
- 30 14. Método para asignar un sujeto humano que padece una enfermedad inflamatoria a uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende sujetos identificados mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 como sujetos humanos con respuesta positiva; y en el que el grupo 2 representa los sujetos restantes.

Fig. 1

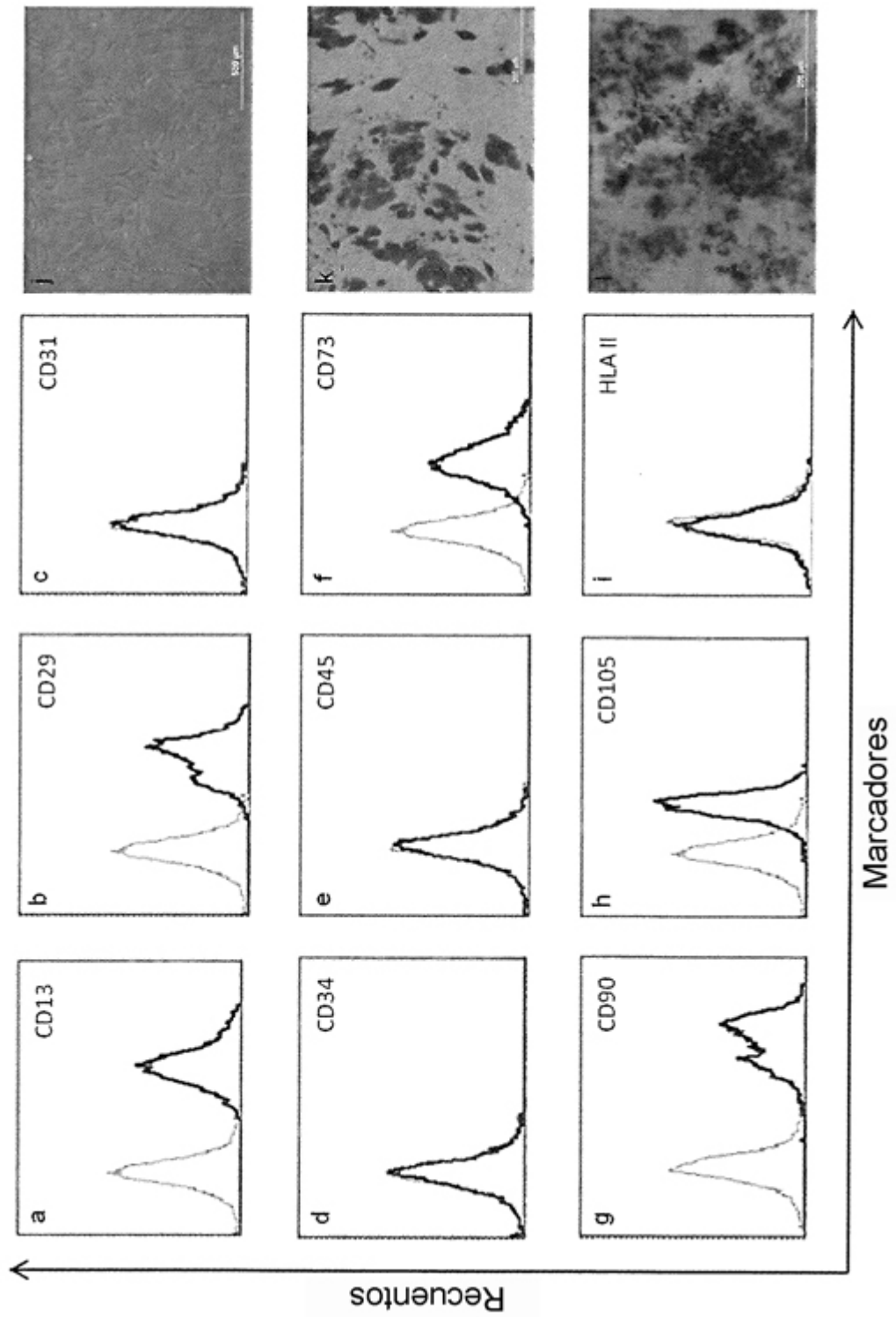


Fig. 2

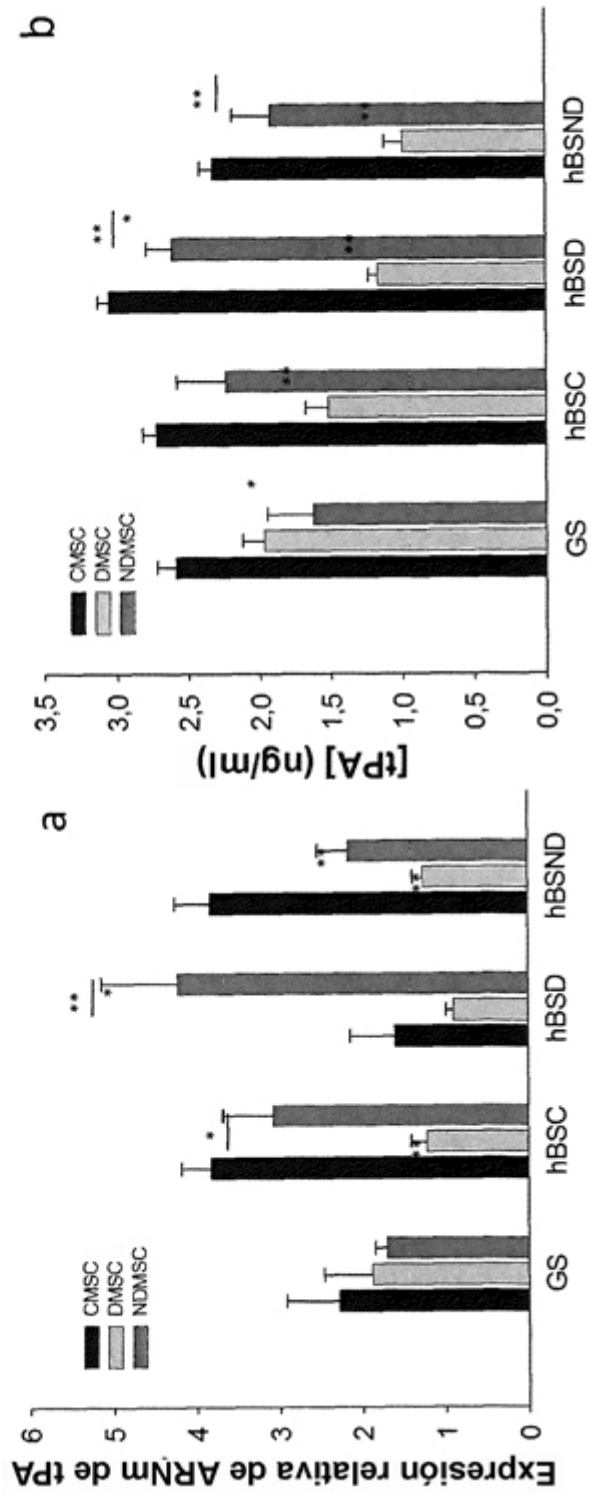


Fig. 3

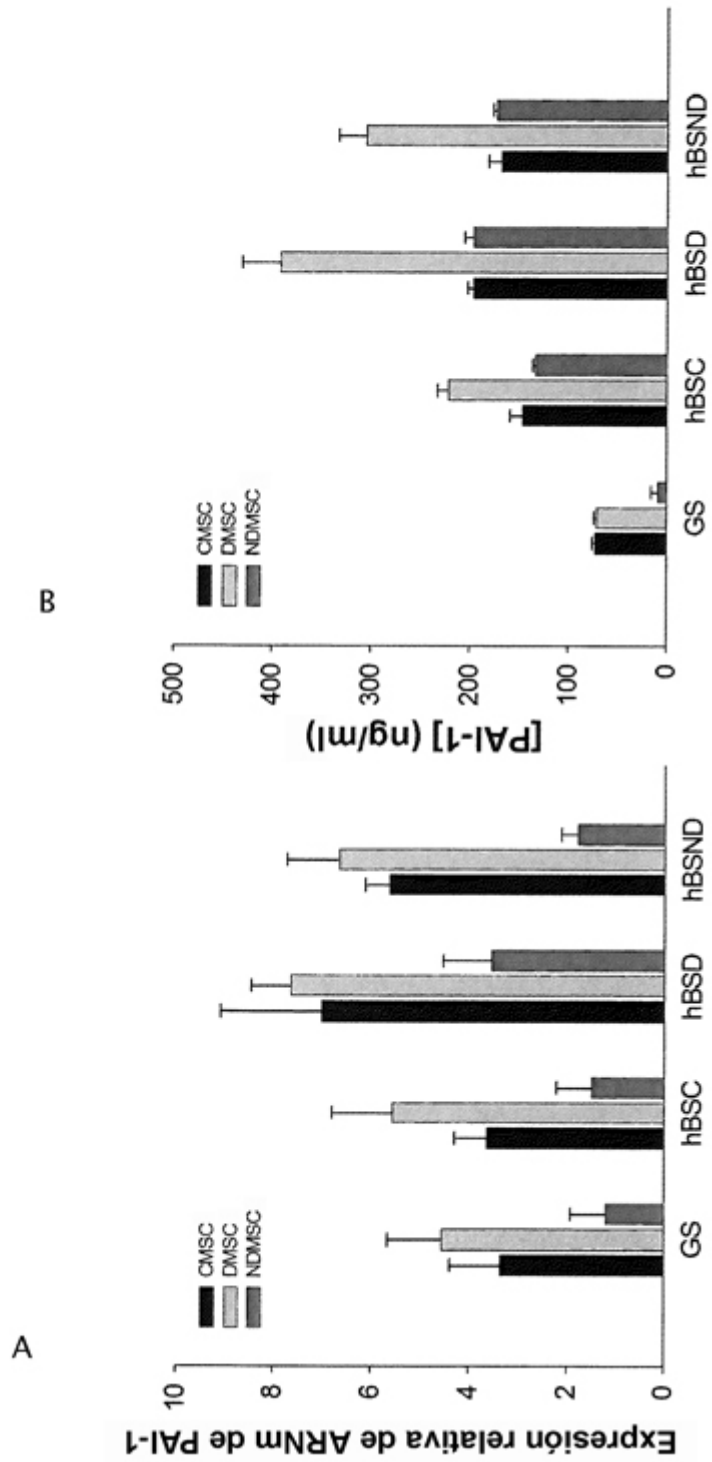


Fig. 4

