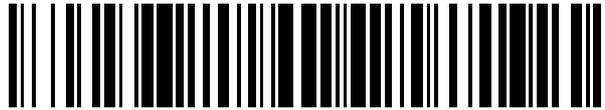


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 774**

21 Número de solicitud: 201700204

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.03.2017

30 Prioridad:

14.03.2016 GB 1604304.4

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.09.2018

71 Solicitantes:

**TIGENIX S.A.U. (100.0%)
Marconi 1 Parque Tecnológico de Madrid
28760 Tres Cantos (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**BRAVO, Eduardo y
PASCUAL, Maria**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Células madre estromales derivadas de tejido adiposo para el uso en el tratamiento de fistulas perianales complejas en la enfermedad de Crohn**

57 Resumen:

Células madre estromales derivadas de tejido adiposo para uso en tratar fistulas perianales complejas resistentes en enfermedad de Crohn.

En el presente documento se proporcionan células madre estromales derivadas de tejido adiposo para uso en el tratamiento de fistulas perianales complejas resistentes en enfermedad de Crohn.

ES 2 681 774 A1

DESCRIPCIÓN

Células madre estromales derivadas de tejido adiposo para uso en el tratamiento de fístulas perianales complejas resistentes en enfermedad de Crohn

5

Campo de la invención

Esta invención se refiere a células madre derivadas de tejido adiposo para uso en el tratamiento de fístulas perianales complejas resistentes en pacientes con enfermedad de Crohn.

10

Antecedentes de la invención

En general, una fístula es una conexión o pasaje anómalo entre órganos o vasos que normalmente no se conectan. Las fístulas se pueden desarrollar en varias partes del cuerpo. Por ejemplo, los tipos de fístulas, nombradas por las áreas del cuerpo en las que se producen, incluyen fístula anorrectal o fístula en el ano o fístula fecal (entre el recto u otra área anorrectal y la superficie de la piel), fístula arteriovenosa o fístula A-V (entre una arteria y vena), fístula biliar (entre los conductos biliares y la superficie de la piel, con frecuencia causada por cirugía de la vesícula biliar), fístula cervical (abertura anómala en el cuello uterino), fístula craneosinusal (entre el espacio intracraneal y un seno paranasal), fístula enteroentérica (entre dos partes del intestino), fístula enterocutánea (entre el intestino y la superficie de la piel, es decir, desde el duodeno o el yeyuno o el íleon), fístula enterovaginal (entre el intestino y la vagina), fístula gástrica (entre el estómago hasta la superficie de la piel), fístula metroperitoneal (entre el útero y la cavidad peritoneal), fístula perilinfática (un desgarramiento entre las membranas entre el oído medio e interno), fístula arteriovenosa pulmonar (entre una arteria y vena de los pulmones, que produce derivación de sangre), fístula rectovaginal (entre el recto y la vagina), fístula umbilical (entre el ombligo y el intestino), fístula traqueoesofágica (entre los tubos respiratorios y alimenticio) y fístula vesicovaginal (entre la vejiga y la vagina). Las causas de las fístulas incluyen traumatismo, complicaciones de tratamiento médico y enfermedad.

20

25

30

El tratamiento para fístulas varía dependiendo de la causa y extensión de la fístula, pero generalmente implica intervención quirúrgica. Se usan comúnmente varios procedimientos quirúrgicos, lo más comúnmente fistulotomía, colocación de un setón (un cordón que se pasa a través de la vía de la fístula para mantenerla abierta para drenaje), o un

35

procedimiento de colgajo endorrectal (donde se mueve tejido sano sobre el lado interno de la fístula para evitar que las heces u otro material vuelvan a infectar el canal). La cirugía para las fístulas anorrectales no carece de efectos secundarios, incluyendo recaída, reinfección e incontinencia.

5

Las enfermedades intestinales inflamatorias, tal como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, son las causas principales de fístulas anorrectales, enteroentéricas y enterocutáneas. La incidencia descrita de fístula en enfermedad de Crohn varía del 17% al 50%. El tratamiento de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn sigue presentando un problema extremadamente desafiante ya que muchas de tales fístulas no responden a los tratamientos disponibles. Tales fístulas y su recaída son una complicación muy dolorosa que reduce significativamente la calidad de vida de los pacientes afectados. Las mejoras recientes en el tratamiento médico (por ejemplo, tratamiento con Infiximab®) y el tratamiento quirúrgico experto han disminuido la necesidad de cirugía complicada. Sin embargo, muchos pacientes no se curan. El no lograr que las fístulas se curen probablemente se debe a la calidad subóptima de tejidos que han sido afectados por la enfermedad de Crohn. En efecto, las fístulas de Crohn proporcionan un sistema modelo para cicatrización en algunas de las peores condiciones posibles.

10

15

Las fístulas perianales son una complicación común de la enfermedad de Crohn^{A1}, que se estima que afectan hasta el 28% de los pacientes en las dos primeras décadas después del diagnóstico^{A2, A3}, particularmente esos con enfermedad colónica e implicación rectal^{A4}. Deterioran gravemente la calidad de vida de los pacientes y producen morbilidad considerable^{A5, A6}. Aproximadamente el 70-80% de las fístulas perianales son complejas^{A3, A7}, y estas son desafiantes de tratar ya que son particularmente resistentes a estrategias de tratamiento convencionales (antibióticos, inmunosupresores) y terapias anti-factor de necrosis tumoral (anti-TNF)^{A8-A12}. Además, el 60-70% de los pacientes recaen al parar el tratamiento^{A13-A17} y solo una minoría de pacientes alcanzan remisión a largo plazo^{A18}.

25

30

El fracaso de o la intolerabilidad a la terapia médica puede finalmente producir enfoques quirúrgicos debilitantes, tal como estoma desviado o proctomía^{A19}. Por tanto, permanece una gran necesidad insatisfecha para tratamientos médicos alternativos.

35

Las células estromales mesenquimatosas (MSC) son células estromales no hematopoyéticas que son capaces de diferenciarse a tejidos mesenquimatosos tal como hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, y adiposo. Las MSC se pueden aislar

fácilmente de tejidos tal como médula ósea o tejido adiposo y expandir rápidamente en cultivo. El documento WO-A-2006/136244 describe el tratamiento de fístulas usando composiciones que contienen células estromales derivadas de tejido adiposo. Las células estromales mesenquimatosas adiposas son un nuevo enfoque terapéutico prometedor, que puede ser útil para el tratamiento de fístulas perianales complejas debido a su potencial antiinflamatorio y regenerador de tejido^{A20-A22}. La prueba de concepto inicial se obtuvo previamente en un estudio clínico abierto de fase 1/2a de células madre derivadas del tejido adiposo expandidas, alogénicas (eASC, Cx601) en 24 pacientes de enfermedad de Crohn con fístulas perianales complejas con el 56,3% de los pacientes mostrando cierre completo de la abertura externa y ausencia de acumulaciones medida por IRM de la fístula tratada 24 semanas después del tratamiento^{A23}.

Las fístulas perianales complejas en enfermedad de Crohn son particularmente desafiantes de tratar y existe la necesidad de establecer terapias clínicamente demostradas para el tratamiento de fístulas perianales complejas en la enfermedad de Crohn.

Compendio de la invención

La invención se refiere al suministro de terapias clínicamente comprobadas para tratar fístulas perianales complejas resistentes en enfermedad de Crohn, basadas en los resultados de un estudio controlado con placebo, con doble enmascaramiento, multicentro que evaluó la eficacia y seguridad de eASC en 212 adultos con enfermedad de Crohn y fístulas perianales complejas drenantes, resistentes a tratamiento. Los ejemplos en el presente documento describen un primer estudio de fase 3 controlado con placebo, que evalúa la eficacia y seguridad de células madre derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas solas o añadidas a terapia médica actual para fístulas perianales complejas resistentes a tratamiento en pacientes con enfermedad de Crohn. Los resultados descritos en el presente documento son los criterios de valoración primarios y secundarios a 24 semanas.

Los datos del nuevo ensayo clínico sorprendentemente revelaron que las células madre derivadas de tejido adiposo tratan fístulas perianales complejas de trayecto múltiple especialmente de forma eficaz. Los datos también muestran que el efecto numéricamente mayor de las células se observó en pacientes que recibieron ninguna o ambas terapias, anti-TNF e inmunosupresora, en el momento de la preparación de la fístula. Además, se logró remisión clínica sorprendentemente pronto después del tratamiento, siendo la mediana de

tiempola mediana de tiempo hasta la remisión clínica en el grupo de tratamiento de 6,7 semanas. De forma similar, la mediana de tiempo de respuesta fue de 6,3 semanas. La mejora en el índice de actividad de enfermedad perianal (PDAI) fue significativamente mayor en las semanas 6, 12 y 18. En conjunto, los datos revelan que las eASC alogénicas son una terapia sorprendentemente eficaz para fístulas perianales complejas en pacientes con enfermedad de Crohn, mediante lo cual una única administración es capaz de proporcionar un efecto terapéutico rápido y sostenido incluso en las fístulas muy complejas, más difíciles de tratar, donde la terapia de fármacos previa ha fracasado.

10

Un primer aspecto de la invención proporciona células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para su uso en un método de tratamiento de una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn.

15

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas en la fabricación de un medicamento para tratar una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn.

20

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método de tratar una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn, en un paciente en necesidad de tal tratamiento, que comprende el paso de administrar células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas a la fístula.

25

También se divulgan en el presente documento, entre otras cosas, composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo descritas en el presente documento tienen un fenotipo inequívoco y muestran una homogeneidad de fenotipo beneficiosa, haciéndolas de esta manera más adecuadas para su uso en el tratamiento de fístulas. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo se pueden formular con soluciones u otras sustancias para servir como fármacos o dispositivos médicos, por ejemplo, como suturas o adhesivos. Además, se proporcionan métodos novedosos de tratar fístulas perianales complejas usando células madre estromales derivadas de tejido adiposo, así como kits para la práctica de los mismos.

35

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa el diseño del estudio clínico de fase III. Cx601, células madre, derivadas de tejido adiposo expandidas, alogénicas; FCI, formulario de consentimiento informado; IRM, imagenología de resonancia magnética.

5

La figura 2 resume el destino de los pacientes. Cx601, células madre, derivadas de tejido adiposo alogénicas, expandidas; ITT, intención de tratar, mITT, intención de tratar modificada; * Trombosis venosa profunda, exacerbación de Crohn, obstrucción intestinal, enfermedad de Crohn, absceso anal (n=3); † Fístula, proctalgia, absceso anal (n=4); ‡ Sin curación o empeoramiento de los síntomas; nuevo ciclo de antibióticos; nueva cirugía en la región perianal; § Empeoramiento de la enfermedad de Crohn que requiere cambio en la terapia.

10

La figura 3 muestra el criterio de valoración principal: Remisión clínica y radiológica combinada* en la semana 24 en la población ITT (panel A). Remisión clínica y radiológica combinada* en la semana 24 en la población mITT (panel B). Remisión combinada* en la semana 24 según factores de estratificación de aleatorización, es decir, tratamientos de la enfermedad de Crohn que se reciben en el momento de la aleatorización, en la población mITT (panel C). Cx601, células madre derivadas de tejido adiposo alogénicas, expandidas; IS, inmunosupresor; ITT, intención de tratar, mITT, intención de tratar modificada; TNF, factor de necrosis tumoral. *Evaluación clínica del cierre de todas las aberturas externas tratadas que drenaban en el punto inicial, y la ausencia de acumulaciones >2 cm de las fístulas perianales tratadas en ≥ 2 de 3 dimensiones en evaluación por IRM centralmente enmascarada en la semana 24. Se definió la evaluación clínica del cierre como ausencia de drenaje a pesar de ejercer compresión suave con el dedo.

15

20

25

Descripción detallada de la invención

1. Definiciones:

30

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos y frases tendrán los significados mostrados a continuación. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por el experto en la materia a la que pertenece esta invención.

35

Los artículos “un” y “una” se refieren a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

5 Mediante “tejido adiposo” se quiere decir cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo pardo o blanco, derivado de sitio subcutáneo, epiploico/visceral, mamario, gonadal, u otro sitio de tejido adiposo. Típicamente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. Tales células pueden comprender un cultivo celular primario o una línea celular inmortalizada. El tejido adiposo es de mamífero, más típicamente el tejido adiposo es
10 humano. Una fuente conveniente de tejido adiposo es de cirugía de liposucción, sin embargo, la fuente de tejido adiposo o el método de aislamiento de tejido adiposo no es crítico para la invención.

“Células madre estromales derivadas de tejido adiposo” o “ASC” se refiere a células madre mesenquimatosas de la fracción estromal de tejido adiposo, generalmente de tejido adiposo humano (hASC).
15

El término “adhesivo” se refiere a cualquier sustancia que une o enlaza superficies, por ejemplo, un pegamento.
20

El término “especialidad farmacéutica biológica” se debe entender que significa una sustancia farmacéutica basada en proteína o ácido nucleico para uso terapéutico, que típicamente se produce por medios diferentes de la extracción directa de una fuente biológica nativa (no manipulada).
25

El término “composición celular” se refiere a una preparación de células, preparación que puede incluir, además de las células, componentes no celulares tal como medio de cultivo celular, por ejemplo, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzima, antioxidantes, metales y similares. Además, la composición celular puede tener
30 componentes que no afecten el crecimiento o viabilidad del componente celular, pero que se usan para proporcionar las células en un formato particular, por ejemplo, como matriz polimérica para encapsulación o una preparación farmacéutica.

Una “fístula perianal compleja” es una fístula perianal que tiene uno o más de:

- 35 (i) origen alto inter-, trans- extra- o supra-esfintérico;
(ii) ≥ 2 aberturas externas; o

(iii) acumulaciones asociadas.

La fístula perianal compleja opcionalmente puede tener un mínimo de 2 aberturas internas y 3 externas. Además, la fístula perianal compleja puede haber estado drenando durante al
5 menos 6 semanas antes el tratamiento según la invención.

El término “cultivo” se refiere a cualquier crecimiento de células, organismos, entidades multicelulares, o tejido en un medio. El término “cultivar” se refiere a cualquier método de alcanzar tal crecimiento, y puede comprender múltiples pasos. El término “cultivar más” se
10 refiere a cultivar una célula, organismo, entidad multicelular, o tejido hasta una cierta fase de crecimiento, después usar otro método de cultivo para llevar dicha célula, organismos, entidad multicelular o tejido a otra fase de crecimiento. Un “cultivo celular” se refiere a un crecimiento de células in vitro. En tal cultivo, las células proliferan, pero no se organizan en tejido por sí. Un “cultivo de tejido” se refiere al mantenimiento o crecimiento de tejido, por
15 ejemplo, explantes de órgano primordial o de un órgano adulto in vitro de modo que se conserve su arquitectura y función. Un “cultivo en monocapa” se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican en un medio adecuado mientras que están principalmente unidas entre sí y a un sustrato. Además, un “cultivo en suspensión” se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican mientras están suspendidas en un medio adecuado.
20 Asimismo, un “cultivo de flujo continuo” se refiere al cultivo de células o explantes en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento celular, por ejemplo, viabilidad. El término “medio condicionado” se refiere al sobrenadante, por ejemplo, libre de la célula/tejido cultivado, resultante después de un periodo de tiempo en contacto con las células cultivadas de modo que el medio se ha alterado para incluir ciertos factores
25 paracrinicos y/o autocrinicos producidos por las células y secretados al cultivo. Un “cultivo confluyente” es un cultivo celular en el que todas las células están en contacto y, por tanto, la superficie entera del recipiente de cultivo está cubierta, e implica que las células también han alcanzado su densidad máxima, aunque confluencia no significa necesariamente que la división cesará o que la población no aumentará de tamaño.

30

El término “medio de cultivo” o “medio” se reconoce en la técnica, y se refiere en general a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivas. El término “medio”, como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del medio que rodea las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases
35 y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos, así como medios líquidos que sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tal

como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Los medios gaseosos ejemplares incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas células que crecen en una placa Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término “medio” también se refiere a material que se pretende para uso en un cultivo celular, incluso si no se ha puesto todavía en contacto con células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. De forma similar, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido se vuelve adecuado para cultivo celular, se puede llamar un “medio en polvo”. “Medio definido” se refiere a medios que están hechos de componentes químicamente definidos (habitualmente purificados). Los “medios definidos” no contienen extractos biológicos mal caracterizados tal como extracto de levadura y caldo de vacuno. “Medio rico” incluye medios que están diseñados para soportar el crecimiento de la mayoría o todas las formas viables de una especie particular. Los medios ricos con frecuencia incluyen extractos biológicos complejos. Un “medio adecuado para el crecimiento de un cultivo a alta densidad” es cualquier medio que permita que un cultivo celular alcance una DO600 de 3 o mayor cuando otras condiciones (tal como temperatura y velocidad de transferencia de oxígeno) permiten tal crecimiento. El término “medio basal” se refiere a un medio que fomenta el crecimiento de muchos tipos de microorganismos que no requieren ningún suplemento de nutrientes especial. La mayoría de los medios basales generalmente comprenden cuatro grupos químicos básicos: aminoácidos, hidratos de carbono, sales inorgánicas, y vitaminas. Un medio basal generalmente sirve como la base para un medio más complejo, al que se añaden suplementos tales como suero, tampones, factores de crecimiento, lípidos y similares. Los ejemplos de medios basales incluyen, pero no están limitados a, medio basal de Eagle, medio esencial mínimo, medio de Eagle modificado por Dulbecco, medio 199, mezclas de nutrientes de Ham F-10 y de Ham F-12, McCoy 5A, MEM de Dulbecco/F-1 2, RPMI 1640 y medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM).

Los términos “comprender” y “que comprende” se usan en el sentido inclusivo abierto, que significa que se pueden incluir elementos adicionales.

El término “Cx601” se refiere a una suspensión celular en solución salina tamponada aséptica que contiene células madre derivadas de tejido adiposo humanas expandidas (eASC) de origen alogénico. Estas células se proporcionan en viales desechables sin agentes conservantes. Las células se dan a una dosis de 120 millones de células (5 millones de células/ml) para inyección intralesional.

35

El término “diferenciación” se refiere a la formación de células que expresan marcadores que se sabe están asociados con células que son más especializadas y cercanas a convertirse en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicional. Por ejemplo, en un contexto pancreático, la diferenciación se puede ver en la producción de grupos de células similares a islotes que contienen una proporción aumentada de células beta-epiteliales que producen cantidades aumentadas de insulina. Los términos diferenciación “adicional” o “mayor” se refieren a células que están más especializadas y cercanas a convertirse en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicional que las células de las que se cultivaron. El término “diferenciación final” se refiere a células que se han convertido en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicional.

El término “expandida” como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a células se debe entender que tiene su significado habitual en la técnica, es decir, células que han proliferado *in vitro*. En la técnica se conocen métodos para la preparación de eASC, por ejemplo, como se describe en el documento WO2007/039150. Una ASC se puede expandir para proporcionar una población de células que retiene al menos una función biológica de la ASC, típicamente, la capacidad de adherirse a una superficie plástica, en condiciones de cultivo estándar. La población extendida de células puede retener la capacidad para diferenciarse en uno o más tipos de células.

El término “fístula” se refiere a cualquier pasaje o comunicación o conexión anómala, habitualmente entre dos órganos internos o que lleva de un órgano interno a la superficie del cuerpo. Los ejemplos de fístulas incluyen, pero no están limitados a, fístula anorrectal o fístula en el ano o fístula fecal, fístula arteriovenosa o fístula A-V, fístula biliar, fístula cervical, fístula craneosinusal, fístula enteroentérica, fístula enterocutánea, fístula enterovaginal, fístula gástrica, fístula metroperitoneal, fístula perilinfática, fístula arteriovenosa pulmonar, fístula rectovaginal, fístula umbilical, fístula traqueoesofágica y fístula vesicovaginal. La invención se refiere a fístula perianal.

El término “incluyendo” se usa en el presente documento para significar “incluyendo, pero no limitado a”. “Incluyendo” e “incluyendo, pero no limitado a” se usan de forma intercambiable.

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

“Células estromales mesenquimatosas” (también denominadas en el presente documento “MSC”) son células estromales multipotentes (es decir, son células que son capaces de dar lugar a múltiples tipos diferentes de células), típicamente derivadas de tejido conjuntivo, y son células no hematopoyéticas. Las MSC tienen la capacidad para diferenciarse en o hacia células somáticas tal como células mesodérmicas (por ejemplo, adiposas, condrocitos, osteoblastos) y opcionalmente en o hacia tipos celulares o linajes endodérmicos y/o ectodérmicos. Típicamente, las células tienen la capacidad de diferenciarse en o hacia al menos dos o todos los tipos celulares seleccionados del grupo que consiste en linajes adipocítico, condroblástico y osteoblástico. Las ASC son un tipo de MSC que se obtienen de la fracción estromal del tejido adiposo. Las MSC y ASC son adherentes a plástico en condiciones de cultivo estándar.

Un “parche” es una venda o recubrimiento aplicado para cubrir o proteger una herida u otra llaga.

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

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en el presente documento para referirse a esos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas farmacéuticas que son, en el ámbito de juicio médico razonable, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, equivalente a un cociente beneficio/riesgo razonable.

La frase “soporte farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, excipiente o material encapsulante solvente, sólido o líquido, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada soporte debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente. El término “fenotipo” se refiere a las características observables de una célula, tal como tamaño, morfología, expresión de proteínas, etc.

El término “célula progenitora” se refiere a una célula que tiene la capacidad para crear progenie que son más diferenciadas que ella misma. Por ejemplo, el término se puede referir a una célula indiferenciada o célula diferenciada hasta una extensión corta de la

diferenciación final que es capaz de proliferación y dar lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad para generar un gran número de células madre que pueden a su vez dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. En una forma de realización preferida, el término célula progenitora se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, con frecuencia en diferentes direcciones, por diferenciación, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales, como se produce en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que típicamente se produce a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente que ella misma deriva de una célula multipotente, y así sucesivamente. Mientras que cada una de estas células multipotentes se pueden considerar células madre, la gama de tipos celulares a que cada una puede dar lugar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Tal capacidad puede ser natural o se puede inducir artificialmente tras tratamiento con varios factores. Mediante esta definición, las células madre también pueden ser células progenitoras, así como los precursores más inmediatos a células terminalmente diferenciadas.

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

“Resistente” se debe tomar que significa que no tiene beneficio clínico significativo cuando se usa en el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, sin mejora o alivio significativo de síntomas.

El término “remisión” se refiere al tratamiento con éxito de la fístula. “Remisión clínica” es el cierre de todas las aberturas externas tratadas que estaban drenando en el punto inicial, a pesar de ejercer compresión suave con el dedo. El tiempo a la remisión clínica se define como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la primera evaluación del paciente con remisión clínica. “Remisión combinada” es esta remisión clínica más confirmación por IRM (imagenología por resonancia magnética) de la ausencia de acumulaciones mayores de 2 cm en las fístulas perianales tratadas, en al menos 2 de 3 dimensiones. Esto típicamente se confirma por lectura de IRM central enmascarada. La ausencia de acumulaciones o abscesos es importante porque si no se curan, producirán una nueva fístula.

El término “respuesta” se refiere al cierre de al menos el 50% de todas las aberturas externas tratadas que drenaban en el punto inicial, a pesar de ejercer compresión suave con

el dedo (es decir, clínicamente evaluado). Por tanto, se cumple la respuesta cuando 1 AE se cierra si el número de AE en el punto inicial es 1 o 2, y se cumple cuando 2 AE se cierran si 3 AE estaban presentes en el punto inicial. El tiempo a la respuesta se define como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la primera evaluación de respuesta.

5

El término “recaída” se refiere a, en pacientes con remisión clínica en la evaluación previa, reapertura de cualquiera de las aberturas externas tratadas con drenaje activo clínicamente evaluadas, o el desarrollo de una acumulación perianal mayor de 2 cm de la(s) fístula(s) perianal(es) tratada(s) confirmado por IRM.

10

Como se usa en el presente documento, el término “solución” incluye un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que las células de la invención permanecen viables.

15

El término “sustancialmente puro”, con respecto a poblaciones de células madre derivadas de tejido adiposo, se refiere a una población de células madre derivadas de tejido adiposo que es al menos aproximadamente el 75%, típicamente al menos aproximadamente el 85%, más típicamente al menos aproximadamente el 90%, y lo más típicamente al menos aproximadamente el 95% pura, con respecto a células madre estromales derivadas de tejido adiposo que hacen una población celular total. Reformulado, el término “sustancialmente puro” se refiere a una población de células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la presente invención que contiene menos de aproximadamente el 20%, más típicamente menos de aproximadamente el 10%, lo más típicamente menos de aproximadamente el 5% de células comprometidas a un linaje en la población no amplificada y aislada original antes del posterior cultivo y amplificación.

25

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

30

El término “sutura” se refiere a un hilo o fibra u otro material de sujeción que se puede usar para coser una herida.

35

Una fístula de “trayecto” único tiene una abertura interna y una abertura externa. Una fístula con “múltiples trayectos” tiene más de 1 abertura externa y/o más de 1 abertura interna. Por tanto, una fístula de múltiples trayectos tiene diferentes ramificaciones. Cada abertura externa típicamente representa un trayecto.

El término “tratar” como se usa en el presente documento se refiere a reparar una fístula o herida, así como a prevenir que una fístula o herida empeore o recaiga.

5 “Agente terapéutico” o “terapéutico” se refiere a un agente capaz de tener un efecto biológico deseado en un huésped. Agentes quimioterapéuticos y genotóxicos son ejemplos de agentes terapéuticos que generalmente se sabe que son de origen químico, opuestos a biológicos, o que causan un efecto terapéutico por un mecanismo de acción particular, respectivamente. Los ejemplos de agentes terapéuticos de origen biológico incluyen factores
10 de crecimiento, hormonas, y citoquinas. Se conocen en la técnica una variedad de agentes terapéuticos y se pueden identificar por sus efectos. Ciertos agentes terapéuticos son capaces de regular la proliferación y diferenciación celular. Los ejemplos incluyen nucleótidos quimioterapéuticos, fármacos, hormonas, proteínas no específicas (no anticuerpos), oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que se unen a una
15 secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencias de ARNm)), péptidos, y peptidomiméticos.

2. Composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo

20 La invención implica composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo con ciertas características, tal como un fenotipo particular. Por ejemplo, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo en una composición celular de la invención se pueden caracterizar por expresión de marcadores de superficie celular, tamaño, consumo de glucosa, producción de lactato, y rendimiento/viabilidad celular. Aún
25 otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo que incluyen como un componente celular, preparaciones sustancialmente puras de células madre estromales derivadas de tejido adiposo que tienen un fenotipo particular, o la progenie de las mismas. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la presente
30 invención incluyen no solo poblaciones sustancialmente puras de las células progenitoras, sino que también pueden incluir componentes de cultivo celular, por ejemplo, medio de cultivo que incluye aminoácidos, metales, factores coenzimáticos, así como poblaciones pequeñas de otras células estromales, por ejemplo, algunas de las cuales pueden surgir por posterior diferenciación de las células de la invención. Además, otros componentes no
35 celulares pueden incluir los que hacen el componente celular adecuado para soporte en

circunstancias particulares, por ejemplo, implantación, por ejemplo, cultivo continuo, o adecuadas para uso como un biomaterial o composición farmacéutica.

5 En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo se producen mediante los métodos de cultivo descritos en la sección 3.

Las ASC preferidas son células Cx601. La Denominación Común Internacional propuesta (pero no confirmada) para estas células es "Adalextemcel".

10

Las ASC son adherentes a plástico en condiciones de cultivo estándar.

Las ASC expandidas (eASC) muestran una morfología de tipo fibroblasto en cultivo. Específicamente, estas células son grandes y se caracterizan morfológicamente por un cuerpo celular superficial con pocas proyecciones celulares que son largas y delgadas. El núcleo es grande y redondo con un nucleolo prominente, dando al núcleo un aspecto claro. La mayoría de las eASC muestran esta morfología en forma de huso, pero es habitual que algunas de las células adquieran morfologías poligonales (Zuk et al., 2002).

20 Las eASC Cx601 son positivas para los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105. Por tanto, una forma de realización proporciona una composición que contiene eASC en donde al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95%, o típicamente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98% o 99% de las eASCs expresan los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105. Típicamente, al menos aproximadamente el 90% de las eASC expresan los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105. Más típicamente, al menos aproximadamente el 95% de las eASC expresan los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105.

30

Las eASC Cx601 son negativas para HLAII, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86. Por tanto, una forma de realización proporciona una composición que contiene eASC en donde menos de aproximadamente el 5% de las eASCs expresan los marcadores de superficie HLAII, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86.

35 Más típicamente, menos de aproximadamente el 4%, 3% o 2% de las eASCs expresan los marcadores de superficie HLAII, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86.

En una forma de realización, menos de aproximadamente el 1% de las eASCs expresan los marcadores de superficie HLAI, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86.

5 En algunas formas de realización las eASC pueden expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o siete) de HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105. En algunas formas de realización las eASC pueden no expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete u ocho) de HLAI, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80. En algunas formas de
10 realización, las eASC expresan cuatro o más de HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105 y no expresan cuatro o más de HLAI, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80.

Las ASC humanas expandidas según ciertas formas de realización de la invención se describen en DelaRosa *et al* ("Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-
15 dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells."; Tissue Eng Parte A. Oct 2009;15(10):2795-806. doi: 10.1089/ten.TEA.2008.0630) y en Lopez-Santalla *et al* 2015 ("Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses." STEM CELLS, 33: 3493–3503. doi: 10.1002/stem.2113).

20 En una forma de realización (como se describe en Lopez-Santalla *et al* 2015), aspirados de tejido adiposo humano de donantes sanos se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se digirieron con colagenasa al 0,075% (Tipo I; Invitrogen). La muestra digerida se lavó con suero bovino fetal (SBF) al 10%, se trató con NH₄Cl 160 mM
25 para eliminar los eritrocitos restantes, y se resuspendió en medio de cultivo [Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con SBF al 10%. Las células se sembraron (2-3·10⁴ células/cm²) en botellas de cultivo y se expandieron (37°C, CO₂ al 5%) con cambio del medio de cultivo cada 3-4 días. Las células se transfirieron a una nueva botella (10³ células/cm²) cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Las células se expandieron hasta la
30 duplicación 12-14 y se congelaron. Los experimentos se realizaron con células de donantes sanos de dos hombres y dos mujeres en las duplicaciones de población 12-14. Las ASC se descongelaron del mismo criobanco y se sembraron antes de cada experimento. Las ASC se definieron según los criterios de la Sociedad Internacional para Terapia Celular: son positivas para HLA-I, CD73, CD90 y CD105 y negativas para CD11b, CD14, CD31, CD34 y
35 CD45.

En otra forma de realización (como se describe en DelaRosa *et al* 2009), lipoaspirados obtenidos de tejido adiposo humano de donantes adultos sanos se lavaron dos veces con PBS, y se digirieron a 37°C durante 30 min con 18U=ml de colagenasa de tipo I en PBS. Una unidad de colagenasa libera 1 mM de equivalentes de L-leucina de colágeno en 5 h a 5 37°C, pH 7,5 (Invitrogen Carlsbad, CA). La muestra digerida se lavó con el 10% de suero bovino fetal (SBF), se trató con NH₄Cl 160 mM, se resuspendió en medio de cultivo (DMEM que contenía SBF al 10%), y se filtró a través de una malla de nailon de 40 mm. Las células se sembraron (2-3_104 células=cm²) en botellas de cultivo y se expandieron a 37°C y CO₂ al 5%, cambiando el medio de cultivo cada 7 días. Las células se pasaron a una nueva 10 botella de cultivo (10008 células=cm²) cuando los cultivos alcanzaron el 90% de confluencia. Las células se caracterizaron fenotípicamente por su capacidad para diferenciarse a linajes condro- osteo- y adipo-génicos. Además, las hASC se verificaron por tinción con marcadores de superficie específicos. Las hASC eran positivas para HLA-I, CD90 y CD105, y negativas para HLA-II, CD40, CD80, CD86 y CD34. Se usó un conjunto de 15 seis donantes sanos (tres hombres y tres mujeres, edades entre 35 y 47) en el estudio. Las células se usaron en los pases 4-6.

En algunas formas de realización las ASC (i) no expresan marcadores específicos de CPA; (ii) no expresanIDO constitutivamente (iii) no expresan significativamente MHC II 20 constitutivamente. Típicamente, la expresión de IDO o MHC II se puede inducir por estimulación con IFN- γ .

En algunas formas de realización, las ASC pueden expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o 25 más, o diez o más (por ejemplo, hasta 13)) de los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105. Por ejemplo, las ASC pueden expresar uno o más (por ejemplo, dos, tres, o todos) de los marcadores CD29, CD59, CD90 y CD105, por ejemplo, CD59 y/o CD90.

30 En algunas formas de realización, las MSC pueden no expresar uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más (por ejemplo, hasta 15)) de los marcadores factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100, queratina, CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34, CD45, STRO-1 y CD133, por ejemplo, las MSC no expresan uno o más (por ejemplo, dos, tres o 35 todos) de los marcadores CD34, CD45, CD31 y CD14, por ejemplo, CD31 y/o CD34.

En una forma de realización, se proporciona una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo, en donde al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o típicamente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, o 99% de las células madre expresan los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y/o CD105. En ciertas formas de realización de las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo, menos de aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, y típicamente aproximadamente el 4%, 3%, 2% o 1% de las células madre expresan los marcadores CD34, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y/o CD133.

En otra forma de realización, se proporciona una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo, en donde al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o típicamente al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, o 99% de las células madre expresan los marcadores c-Kit, vimentina y/o CD90. En ciertas formas de realización de las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo, menos de aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, y típicamente aproximadamente el 4%, 3%, 2% o 1% de las células madre expresan los marcadores CD34, factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100 y/o queratina. También se proporciona una población de células madre estromales derivadas de tejido adiposo que expresan los marcadores c-Kit, vimentina y CD90 y no expresan los marcadores CD34, factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100 y queratina.

La caracterización fenotípica de una población celular por marcadores de superficie se puede realizar por tinción individual de las células (citometría de flujo) o haciendo cortes histológicos de la población in situ, hechos según métodos normales. La determinación del perfil de expresión de marcadores de superficie por anticuerpos, caracterización de inmunofenotipo, puede ser directa, usando un anticuerpo marcado, o indirecta, usando un anticuerpo secundario marcado contra el anticuerpo primario específico de marcador celular, alcanzando de esta manera amplificación de señal. Por otra parte, la presencia o ausencia de unión al anticuerpo se puede determinar por diferentes métodos que incluyen, pero no

están limitados a, microscopia de inmunofluorescencia y radiografía. De forma similar, es posible llevar a cabo el seguimiento de los niveles de unión del anticuerpo por citometría de flujo, una técnica que permite que los niveles de fluorocromo se correlacionen con la cantidad de antígenos presentes en la superficie celular unidos específicamente a los anticuerpos marcados. La expresión diferencial de una serie de marcadores de superficie en una población celular proporciona un método para la identificación y aislamiento de dicha población. Según esto, típicamente se puede usar FACS (separación celular activada por fluorescencia).

En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo son suspensiones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo en varias soluciones o materiales, por ejemplo, para uso como fármacos o biomateriales, como se describe en más detalle posteriormente. En una forma de realización, la composición celular comprende una suspensión de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto en solución de Ringer y HSA. En otra forma de realización, la composición celular comprende una suspensión de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto en un material, tal como un polímero, pegamento, gel, etc. Tales suspensiones se pueden preparar, por ejemplo, sedimentando las células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto de un medio de cultivo y resuspendiéndolas en la solución o material deseado. Las células se pueden sedimentar y/o cambiar del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, filtración, ultrafiltración, etc.

La concentración de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto en las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto puede ser al menos aproximadamente 5×10^6 células/ml, al menos aproximadamente 10×10^6 células/ml, al menos aproximadamente 20×10^6 células/ml, al menos aproximadamente 30×10^6 células/ml, o al menos aproximadamente 40×10^6 células/ml. Típicamente la concentración entre aproximadamente 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml, por ejemplo, entre aproximadamente 5×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml. En el ensayo clínico descrito en los ejemplos, las eASC se administraron a una concentración de 5 millones de células/ml.

Según esto, otro aspecto de la presente invención se refiere a la progenie de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto, por ejemplo, esas células que se han derivado de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo. Tal progenie puede incluir generaciones posteriores de células madre estromales derivadas de tejido adiposo, así como células de linaje comprometido generadas induciendo diferenciación de las células

madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto después de su aislamiento del explante, por ejemplo, inducida *in vitro*. En ciertas formas de realización, las células progenie se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, 5 aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pases de la población parental. Sin embargo, las células progenie se pueden obtener después de cualquier número de pases de la población parental.

10 En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la invención se proporcionarán como parte de una preparación farmacéutica, por ejemplo, una preparación estéril, libre de la presencia de virus, bacterias u otros patógenos no deseados, así como sin pirógenos. Es decir, para administración humana, las composiciones objeto deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, así como de seguridad general y pureza, como requiere la Oficina de la FDA 15 para estándares de sustancias biológicas.

Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo expandidas son alogénicas con respecto al huésped de trasplante. Debido a las dificultades en obtener suficientes células madre autólogas, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo de un donante 20 alogénico constituyen una fuente alternativa valiosa de células madre para uso terapéutico. Se sabe en la técnica que células madre estromales de médula ósea y células madre estromales derivadas de tejido adiposo no provocan una respuesta de linfocitos alogénicos *in vitro* y consecuentemente, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas derivadas de un donante se podrían usar para cualquier paciente, 25 independientemente de la incompatibilidad del MHC.

Los métodos de administrar las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo a sujetos, particularmente sujetos humanos, que se describen en detalle en el presente documento, incluyen inyección o implante de las células en sitios 30 diana en los sujetos, las células se pueden insertar en un dispositivo de administración que facilita la introducción por inyección o implante, de las células en los sujetos. Tales dispositivos de administración incluyen tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una forma de realización preferida, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la cual las composiciones 35 que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo se pueden introducir en el sujeto en una localización deseada. Las composiciones que contienen células madre

estromales derivadas de tejido adiposo se pueden insertar en tal dispositivo de administración, por ejemplo, una jeringa, en diferentes formas. Por ejemplo, las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo incluyen composiciones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo que están suspendidas en una solución o embebidas en una matriz soporte cuando están contenidas en tal dispositivo de administración.

Los soportes y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, solventes y/o medios de dispersión. El uso de tales soportes y diluyentes se conoce bien en la técnica. La solución típicamente es estéril y fluida hasta el grado de que existe fácil jeringabilidad. Típicamente la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos tal como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. Las soluciones que son composiciones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la invención se pueden preparar incorporando células madre estromales derivadas de tejido adiposo como se describen en el presente documento en un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguido por esterilización por filtración.

Algunos ejemplos de materiales y soluciones que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tal como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tal como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

En ciertas formas de realización, las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo comprenden además un adhesivo. En ciertas formas de

realización, el adhesivo es un adhesivo basado en fibrina, tal como gel de fibrina o pegamento de fibrina o polímero o adhesivo basado en fibrina, u otro adhesivo tisular o pegamento quirúrgico, tal como, por ejemplo, cianoacrilato, colágeno, trombina y polietilenglicol. Otros materiales que se pueden usar incluyen, pero no están limitados a, 5 alginato de calcio, agarosa de tipos I, II, IV u otras isoformas de colágeno, ácido poliláctico/poli-glicólico, derivados de hialuronato u otros materiales (Perka C. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:305-311; Sechriest VF. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:534-541; Chu CR et al. (1995) J. Biomed. Mater. Res. 29:1147-1154; Hendrickson DA et al. (1994) Orthop. Res. 12:485-497). En otras formas de realización, el adhesivo es un apósito 10 líquido, en donde las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo del método se mezclan con el material de apósito líquido. Un “apósito líquido” es una solución que comprende un compuesto, por ejemplo, un material polimérico, que se aplica a una herida con un spray o un cepillo, seguido por la eliminación del solvente por evaporación para proporcionar una película protectora sobre la herida.

15

Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la invención también se pueden usar para recubrir un soporte, por ejemplo, un dispositivo médico. Por ejemplo, el soporte puede ser una sutura o hilo.

20 El soporte se puede recubrir con las células de cualquier manera que conozca un experto en la materia, por ejemplo, empapando, rociando, pintando, imprimiendo, etc.

En una forma de realización, el soporte es una sutura, grapa, hilo absorbible, hilo no absorbible, hilo natural, hilo sintético, hilo monofilamento o hilo multifilamento (también 25 llamados trenzas). Los métodos preferidos de preparar suturas y otros soportes usados para cerrar heridas recubiertos con células madre estromales derivadas de tejido adiposo se divulgan en la solicitud de patente en EE UU No. 11/056.241 “Biomateriales para sutura”, presentada el 14 de febrero, 2005, solicitud que se incorpora mediante referencia en su totalidad. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido 30 adiposo divulgadas en el presente documento representan composiciones novedosas que se pueden usar con los métodos divulgados en la solicitud de patente en EE UU No. 11/056.241.

Además, en cualquiera de las composiciones que contienen células madre estromales 35 derivadas de tejido adiposo, se puede incorporar al menos un agente terapéutico en la composición (aunque no se requiere y opcionalmente se puede excluir). Por ejemplo, una

composición puede contener un analgésico, para ayudar en tratar la inflamación o dolor en el sitio de la fístula, o un agente antiinfeccioso para prevenir la infección del sitio tratado con la composición.

5 Más específicamente, los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos útiles incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, tal como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agonistas de opio y salicilatos; agentes anti-infecciosos, tal como antihelmínticos, antianaeróbicos, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, antibióticos de cefalosporina, antibióticos macrólidos, antibióticos β -lactama
 10 mezcla, antibióticos de penicilina, antibióticos de quinolona, antibióticos sulfonamidas, antibióticos tetraciclinas, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosis, antiprotozoicos, antiprotozoicos antipalúdicos, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabicidas, agentes anti-inflamatorios, agentes anti-inflamatorios corticosteroides, anestésicos antipruriginosos/locales, anti-infecciosos tópicos, anti-infecciosos tópicos
 15 antifúngicos, anti-infecciosos tópicos antivirales; agentes electrolíticos y renales, tal como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, diuréticos de inhibidor de anhidrasa carbónica, diuréticos de bucle, diuréticos osmóticos, diuréticos que ahorran potasio, diuréticos de tiacida, sustitutos de electrolitos y agentes uricosúricos; enzimas, tal como enzimas pancreáticas y enzimas trombolíticas; agentes gastrointestinales, tal como
 20 antidiarreicos, antieméticos, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agentes antiinflamatorios gastrointestinales de salicilato, agentes anti-ulcera antiácido, agentes anti-úlceras inhibidores de bomba ácida gástrica, agentes anti-úlceras mucosa gástrica, agentes anti-úlceras bloqueantes de H₂, agentes colestílicos, digestivos, eméticos, laxantes y ablandadores de heces, y agentes procinéticos; anestésicos generales, tal como
 25 anestésicos de inhalación, anestésicos de inhalación halogenados, anestésicos intravenosos, anestésicos intravenosos de barbiturato, anestésicos intravenosos de benzodiacepina y anestésicos intravenosos de agonistas de opio; hormonas y modificadores de hormonas, tal como abortivos, agentes suprarrenales, agentes suprarrenales corticosteroides, andrógenos, anti-andrógenos, agentes inmunobiológicos, tal
 30 como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides, y vacunas; anestésicos locales, tal como anestésicos locales de amida y anestésicos locales de éster; agentes musculoesqueléticos tal como agentes antiinflamatorios anti-gota, agentes antiinflamatorios corticosteroides, agentes antiinflamatorios de compuestos de oro, agentes antiinflamatorios inmunosupresores, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), agentes
 35 antiinflamatorios de salicilato, minerales; y vitaminas, tal como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E, y vitamina K.

Las clases preferidas de agentes terapéuticos de las categorías anteriores incluyen: (1) analgésicos en general, tal como lidocaína o derivados de la misma, y analgésicos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluyendo diclofenac, ibuprofeno, cetoprofeno, y naproxeno; (2) analgésicos agonistas de opiato, tal como codeína, fentanilo, hidromorfona, y morfina; (3) analgésicos de salicilato, tal como aspirina (ASA) (ASA con recubrimiento entérico); (4) antihistaminas bloqueantes de H₁, tal como clemastina y terfenadina; (5) agentes antiinfecciosos, tal como mupirocina; (6) antiinfecciosos antianaeróbicos, tal como cloranfenicol y clindamicina; (7) antiinfecciosos antibióticos antifúngicos, tal como anfotericina b, clotrimazol, fluconazol, y cetoconazol; (8) antiinfecciosos antibióticos macrólidos, tal como azitromicina y eritromicina; (9) antiinfecciosos antibióticos de β-lactama mezcla, tal como aztreonam e imipenem; (10) antiinfecciosos antibióticos de penicilina, tal como nafcilina, oxacilina, penicilina G, y penicilina V; (11) antiinfecciosos antibióticos de quinolona, tal como ciprofloxacina y norfloxacina; (12) antiinfecciosos antibióticos de tetraciclina, tal como doxiciclina, minociclina, y tetraciclina; (13) antiinfecciosos antimicobacterianos antituberculosis tal como isoniacida (INH), y rifampina; (14) antiinfecciosos antiprotozoicos, tal como atovacuona y dapsone; (15) antiinfecciosos antiprotozoicos antipalúdicos, tal como cloroquina y pirimetamina; (16) antiinfecciosos anti-retrovirales, tal como ritonavir y zidovudina; (17) agentes antiinfecciosos antivirales, tal como aciclovir, ganciclovir, interferón alfa, y rimantadina; (18) antiinfecciosos tópicos antifúngicos, tal como anfotericina B, clotrimazol, miconazol, y nistatina; (19) antiinfecciosos tópicos antivirales, tal como aciclovir; (20) agentes electrolíticos y renales, tal como lactulosa; (21) diuréticos de bucle, tal como furosemida; (22) diuréticos que ahorran potasio, tal como triamtereno; (23) diuréticos de tiacida, tal como hidroclorotiacida (HCTZ); (24) agentes uricosúricos, tal como probenecida; (25) enzimas tal como RNasa y DNasa; (26) antieméticos, tal como proclorperacina; (27) agentes antiinflamatorios gastrointestinales de salicilato, tal como sulfasalacina; (28) agentes anti-úlceras inhibidores de bomba ácida gástrica, tal como omeprazol; (29) agentes anti-úlceras bloqueantes de H₂, tal como cimetidina, famotidina, nizatidina, y ranitidina; (30) digestivos, tal como pancrelipasa; (31) agentes procinéticos, tal como eritromicina; (32) anestésicos locales de éster, tal como benzocaína y procaína; (33) agentes antiinflamatorios corticoesteroides musculosqueléticos, tal como beclometasona, betametasona, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, y prednisona; (34) inmunosupresores antiinflamatorios musculosqueléticos, tal como azatioprina, ciclofosfamida, y metotrexato; (35) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) musculosqueléticos, tal como diclofenac, ibuprofeno, cetoprofeno, cetorlac, y naproxeno; (36) minerales, tal como hierro, calcio, y magnesio; (37) compuestos de vitamina

B, tal como cianocobalamina (vitamina B₁₂) y niacina (vitamina B₃); (38) compuestos de vitamina C, tal como ácido ascórbico; y (39) compuestos de vitamina D, tal como calcitriol.

En ciertas formas de realización, el agente terapéutico puede ser un factor de crecimiento u
 5 otra molécula que afecta la diferenciación y/o proliferación celular. Los factores de crecimiento que inducen estados de diferenciación final se conocen bien en la técnica, y se pueden seleccionar de cualquiera de tales factores que se haya mostrado que induce un estado de diferenciación final. Los factores de crecimiento para uso en los métodos descritos en el presente documento pueden, en ciertas formas de realización, ser variantes
 10 o fragmentos de un factor de crecimiento natural. Por ejemplo, se puede generar una variante haciendo cambios de aminoácidos conservadores y probando la variante resultante en uno de los ensayos funcionales descritos anteriormente u otro ensayo funcional conocido en la técnica. Sustituciones de aminoácidos conservadoras se refiere a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos
 15 que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparragina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales
 20 básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparragina-glutamina.

25 Como apreciarán los expertos en la materia, se pueden generar variantes o fragmentos de factores de crecimiento polipeptídicos usando técnicas convencionales, tal como mutagénesis, incluyendo crear distintas mutación(es) puntual(es), o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a variantes que retienen sustancialmente la misma, o solo un subconjunto, de la actividad biológica de un factor de crecimiento polipeptídico del
 30 que se derivó.

3. Métodos de preparar composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo

35 Los métodos para el aislamiento y cultivo de ASC para proporcionar eASC y poblaciones celulares de la invención, y composiciones que comprenden poblaciones celulares de la

invención se conocen en la técnica. Típicamente, los métodos para la preparación de composiciones que comprenden poblaciones celulares comprenden los siguientes pasos:

- 5 (i) aislamiento de ASC de la fracción estromal de tejido adiposo y selección por adherencia a una superficie adecuada, por ejemplo, plástico,
- (ii) expansión de las ASC para proporcionar poblaciones celulares de la invención que comprenden eASC.

10 Opcionalmente, las poblaciones celulares de la invención se pueden crioconservar durante y/o posteriormente al paso de expansión (ii). Opcionalmente, el fenotipo de las poblaciones celulares de la invención se puede evaluar durante y/o posteriormente al paso de expansión (ii). Opcionalmente, las poblaciones celulares de la invención se pueden aislar posteriormente al paso de expansión (ii) y resuspender en un soporte y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15

Se pueden obtener ASC por cualquier medio estándar en la técnica. Típicamente, dichas células se obtienen desasociando las células del tejido fuente (por ejemplo, lipoaspirados o tejido adiposo), típicamente tratando el tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa. La materia tisular digerida se filtra después típicamente a través de un filtro de entre 20 aproximadamente 20 micras a 1 mm. Las células se aíslan después (típicamente por 20 centrifugación) y se cultivan en una superficie adherente (típicamente placas o botellas de cultivo). Tales métodos se conocen en la técnica y, por ejemplo, son como se divulga en la patente en EE UU No. 6777231. Según esta metodología, los lipoaspirados se obtienen de tejido adiposo y las células derivan del mismo. En el curso de esta metodología, las células 25 se pueden lavar para eliminar restos celulares contaminantes y glóbulos rojos, preferiblemente con PBS. Las células se digieren con colagenasa (por ejemplo, a 37°C durante 30 minutos, colagenasa al 0,075%; tipo I, Invitrogen Carlsbad, CA) en PBS. Para eliminar los glóbulos rojos restantes, la muestra digerida se puede lavar (por ejemplo, con suero bovino fetal al 10%), tratar con CINH4 160 mmol/l, y por último resuspender en medio 30 DMEM completo (DMEM que contiene SBF al 10%, glutamina 2 mmol/l y penicilina/estreptomicina al 1%). Las células se pueden filtrar a través de una malla de nailon de 40 µm.

Las células se cultivan en un recipiente de cultivo celular adecuado, que comprende una 35 superficie adecuada para la adherencia de las ASC, por ejemplo, plástico. Las células no adherentes se eliminan, por ejemplo, lavando en un tampón adecuado, para proporcionar

una población aislada de células estromales adherentes (por ejemplo, ASC). Las células aisladas de esta manera se pueden sembrar (preferiblemente a 2-3x10⁴ células/cm²) en botellas de cultivo y expandir a 37°C y CO₂ al 5%, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Las células preferiblemente se separan de la superficie adherente (por ejemplo, mediante tripsina) y se pasan (“pasadas”) a una nueva botella de cultivo (1.000 células/cm²) cuando los cultivos alcanzan aproximadamente el 90% de confluencia.

El aislamiento de células preferiblemente se lleva a cabo en condiciones estériles o GMP.

10 En una forma de realización, un método comprende: (a) recoger tejido adiposo de un sujeto; (b) obtener una suspensión celular por digestión enzimática; (c) sedimentar la suspensión celular y resuspender las células en un medio de cultivo; (d) cultivar las células durante al menos aproximadamente 10 días; y (g) expandir las células durante al menos dos pases de cultivo.

15

Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo son alogénicas, es decir, no aisladas del tejido adiposo del sujeto en el que la composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo final se va a introducir.

20 En ciertas formas de realización, las células se cultivan durante al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 25 días, o al menos aproximadamente 30 días. Típicamente, la expansión de células en cultivo mejora la homogeneidad del fenotipo celular en la población celular, de modo que se obtiene una población sustancialmente pura u homogénea.

25

En ciertas formas de realización, las células se expanden en cultivo durante al menos tres pases de cultivo o “se pasan al menos tres veces”. En otras formas de realización, las células se pasan al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, o al menos diez veces. Es preferible que las células se pasen más de tres veces para mejorar la homogeneidad del fenotipo celular en la población celular. En efecto, las células se pueden expandir en cultivo indefinidamente siempre que la homogeneidad del fenotipo celular mejore y se mantenga la capacidad diferencial.

35 En ciertas formas de realización, las células se multiplican en cultivo durante al menos tres duplicaciones de población. En ciertas formas de realización, las células se expanden en

cultivo durante al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 15 o 20 duplicaciones de población. En ciertas formas de realización, las células se expanden en cultivo durante menos de siete, ocho, nueve, diez, 15 o 20 duplicaciones de población. En ciertas formas de realización, las células se expanden en cultivo durante entre aproximadamente 5 y 10 duplicaciones de población. En ciertas formas de realización, las células se expanden en cultivo durante entre aproximadamente 10 y 15 duplicaciones de población.

En ciertas formas de realización, las células se expanden en cultivo durante entre aproximadamente 15 y 20 duplicaciones de población, por ejemplo, aproximadamente 16 duplicaciones de población.

Las células se pueden cultivar por cualquier método conocido en la técnica para el cultivo de células madre. Se puede encontrar una discusión de varias técnicas de cultivo, así como su aumento a escala, en Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4ª Edición, Wiley-Liss 2000. Las células se pueden expandir usando botellas de cultivo o biorreactores adecuados para expansión a gran escala. Los biorreactores adecuados para la expansión a gran escala de células estromales mesenquimatosas están comercialmente disponibles y pueden incluir biorreactores de expansión tanto 2D (es decir, sustancialmente planos) como 3D. Los ejemplos de tales biorreactores incluyen, pero no están limitados a, un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor de perfusión, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario. En ciertas formas de realización, las células se cultivan por cultivo en monocapa. En una forma de realización, las células se cultivan y pasan como se describe en el ejemplo A posteriormente.

Se puede usar cualquier medio capaz de soportar células estromales en cultivo celular. Las formulaciones de medios que soportan el crecimiento de fibroblastos incluyen, pero no están limitadas a, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo alfa modificado (alfa.MEM) y medio del Instituto Memorial Roswell Park 1640 (medio RPMI 1640) y similares. Típicamente, se añadirá del 0 al 20% de suero bovino fetal (SBF) o del 1-20% de suero de caballo a los medios anteriores para soportar el crecimiento de células estromales y/o condrocitos. Sin embargo, se podría usar un medio definido si los factores de crecimiento, citoquinas y hormonas necesarios en el SBF para células estromales y condrocitos se identifican y proporcionan a concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Los medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, incluyendo, pero no limitados a, antibióticos, compuestos mitogénicos o de diferenciación para células estromales. Las células se harán crecer a

temperaturas entre 31°C a 37°C en un incubador humidificado. El contenido en dióxido de carbono se mantendrá entre el 2% al 10% y el contenido en oxígeno entre el 1% y el 22%. Las células pueden permanecer en este medio durante periodos de hasta 4 semanas.

5 Los antibióticos que se pueden suplementar en el medio incluyen, pero no están limitados a, penicilina y estreptomicina. La concentración de penicilina en el medio de cultivo químicamente definido es aproximadamente de 10 hasta aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomicina en el medio de cultivo químicamente definido es aproximadamente de 10 hasta aproximadamente 200 ug/ml.

10

Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo se pueden transfectar o transducir de forma estable o transitoria con un ácido nucleico de interés usando una estrategia de vector plásmido, vírico o alternativo. Los ácidos nucleicos de interés incluyen, pero no están limitados a, los que codifican productos génicos que aumentan la producción de componentes de matriz extracelular encontrados en el tipo de tejido que se va a reparar, por ejemplo, pared intestinal o pared vaginal.

15

La transducción de vectores víricos que portan genes reguladores en las células madre estromales se puede realizar con vectores víricos (adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados u otro vector) purificados por formación de bandas en cloruro de cesio u otro método a una multiplicidad de infección (unidades de virus:célula) de entre 10:1 a 2000:1. Las células se expondrán al virus en medio sin suero o que contiene suero en ausencia o presencia de un detergente catiónico tal como polietilenimina o Lipofectamine.TM durante un periodo de 1 hora a 24 horas (Byk T. et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B. et al. (1999) Calcif. Tissue Int. 64:45-49).

20

25

Otros métodos adecuados para transferir vectores o plásmidos en células madre incluyen complejos lípidos/ADN, tal como los descritos en las patentes en EE UU No. 5.578.475; 5.627.175; 5.705.308; 5.744.335; 5.976.567; 6.020.202; y 6.051.429. Los reactivos adecuados incluyen lipofectamina, una formulación en liposomas 3:1 (p/p) del lípido policationico trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) (Nombre del Chemical Abstracts Registry: trifluoroacetato de N-[2-(2,5-bis[(3-aminopropil)amino]-1-oxpentil}amino)etil]-N,N-dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanaminio), y el lípido neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada por membrana. Ejemplar es la formulación Lipofectamine 2000TM (disponible de Gibco/Life Technologies # 11668019). Otros reactivos incluyen: reactivo de transfección FuGENETM 6

30

35

- (una mezcla de lípidos en forma no liposómica y otros compuestos en etanol al 80%, obtenible de Roche Diagnostics Corp. # 1814443); y reactivo de transfección LipoTAXITM (una formulación lipídica de Invitrogen Corp., #204110). La transfección de células madre se puede realizar por electroporación, por ejemplo, como se describe en M.L. Roach y J.D. McNeish (2002) *Methods in Mol. Biol.* 185:1. Los sistemas de vectores víricos adecuados para producir células madre con alteraciones genéticas estables se pueden basar en adenovirus y retrovirus, y se pueden preparar usando componentes de virus comercialmente disponibles.
- 5
- 10 La transfección de vectores plásmidos que portan genes reguladores en las células madre estromales se pueden introducir en las células en cultivos en monocapa mediante el uso de precipitación de ADN con fosfato de calcio o métodos de detergentes catiónicos (Lipofectamine.TM., DOTAP) o en cultivos tridimensionales por incorporación de los vectores de ADN de plásmido en el polímero biocompatible (Bonadio J. et al. (1999) *Nat. Med.* 5:753-759).
- 15

Para el seguimiento y detección de proteínas funcionales codificadas por estos genes, los vectores de ADN vírico o de plásmido contendrán un gen marcador fácilmente detectable, tal como la proteína fluorescente verde o enzima beta-galactosidasa, ambos de los cuales se pueden seguir por medios histoquímicos.

20

4. Tratamiento de fístulas perianales complejas

La invención se refiere al tratamiento de fístulas perianales complejas en pacientes con enfermedad de Crohn, usando células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas. Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo típicamente comprenden una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo descrita en el presente documento, algunas veces denominas "Cx601". Sin embargo, otras preparaciones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, tal como las descritas en las patentes en EE UU No. 6.777.231 y 6.555.374 y la solicitud de patente en EE UU No. 11/065.461 "Identificación y aislamiento de células multipotentes de tejido mesenquimatoso no osteocóndrico", presentada el 25 de febrero, 2005.

25

30

Los ejemplos muestran que las eASC alogénicas son una terapia sorprendentemente eficaz para fístulas perianales complejas en pacientes con enfermedad de Crohn, por lo cual una

35

única administración es capaz de proporcionar un efecto terapéutico rápido y sostenido en las fístulas muy complejas más difíciles de tratar que no han respondido a tratamientos previos. Por ejemplo, el beneficio típicamente se ve en aproximadamente 6 semanas, y beneficio que típicamente se sostiene hasta 24 semanas desde la terapia.

5

En una forma de realización, un método de tratar una fístula perianal resistente compleja en un paciente con enfermedad de Crohn comprende inyectar aproximadamente 120 millones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas por vía intralesional, en todos los trayectos de la fístula. Para evitar dudas, en esta forma de realización, se administran 120 millones de células al paciente en un único procedimiento, cada trayecto de la fístula recibe al menos una proporción de esta dosis. Aproximadamente la mitad de la dosis se inyecta en el tejido que rodea la abertura o aberturas interna(s). La otra mitad se inyecta en las paredes de la fístula (no más profundo de 2 mm) a lo largo del/de los trayecto(s) de la fístula, haciendo varias micro-burbujas. Los datos en los ejemplos muestran que esta única administración es capaz de proporcionar remisión combinada en 24 semanas o menos, incluso en aproximadamente 6 semanas o en aproximadamente 8 semanas. Según esto, en una forma de realización, el tratamiento consiste en esta administración intralesional de 120 millones de eASC.

20 La inyección intralesional típicamente se lleva a cabo como en el ensayo clínico ejemplificado, por lo cual la suspensión celular se inyecta a través de la(s) abertura(s) interna(s) (con la jeringa entrando a través del ano) y a través de las paredes de los trayectos de la fístula (con la jeringa entrando a través de abertura externa de la fístula).

25 El paciente puede ser hombre o mujer. El paciente típicamente es un adulto.

En una forma de realización, cualquier setón que pudiera estar presente se elimina primero. Típicamente, se hace un legrado de la fístula antes de la administración de las eASC. Las aberturas internas se pueden suturar opcionalmente. Las eASC se administran después con una aguja fina, larga. Como se ha indicado anteriormente, aproximadamente la mitad de la dosis se inyecta en el tejido que rodea la(s) abertura(s) interna(s) suturada(s). La otra mitad se inyecta en las paredes de la fístula (no más profundo de 2 mm) a lo largo del/de los trayecto(s) de la fístula, haciendo varias micro-burbujas.

35 Antes de la terapia según la invención, se puede realizar un escáner de IRM pélvico en la selección para guiar los procedimientos quirúrgicos. Los pacientes también se pueden

someter a legrado de la fístula y colocación de setón según esté clínicamente indicado ≥ 2 semanas antes de la administración del producto de investigación (Fig. 1). Si se colocó un setón, se retira inmediatamente antes de la administración del producto de investigación.

5 El paciente que se va a tratar tiene enfermedad de Crohn, típicamente enfermedad de Crohn luminal. Típicamente, el paciente ha tenido enfermedad de Crohn luminal no activa o moderadamente activa, por ejemplo, como se define por un índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CAI) de $\leq 220^{A24}$. El paciente puede haber tenido enfermedad de Crohn durante al menos 6 meses.

10

El paciente tiene al menos una fístula perianal compleja. En una forma de realización, el paciente no tiene una fístula rectovaginal, estenosis rectal, estenosis anal, proctitis grave activa (definida por la presencia de úlceras superficiales o profundas), estomas divergentes, o un absceso o acumulaciones > 2 cm que no se resolvieron por el procedimiento de preparación quirúrgica.

15

Los pacientes son resistentes a al menos una terapia de fármacos previa. La terapia previa puede ser un fármaco de molécula pequeña o especialidad farmacéutica biológica. Típicamente, el paciente ha recibido dicho tratamiento durante al menos aproximadamente

20 4, 6, 12, 18, 24 o 36 semanas y todavía presenta síntomas de enfermedad activa. En otras palabras, incluso después de tratamiento durante al menos aproximadamente 4, 6, 12, 18, 24 o 36 semanas, la gravedad de la fístula no ha mejorado. La terapia previa puede ser terapia de antibióticos tal como ciprofloxacina o metronidazol, terapia inmunosupresora (por ejemplo, un análogo de purina tal como azatioprina o 6-mercaptopurina, un análogo de

25 pirimidina tal como fluorouracilo, o un análogo de ácido fólico tal como metotrexato), o terapia anti-TNF tal como Adalimumab (Humira), Certolizumab (Cimzia), Etanercept (Enbrel), Golimumab (Simponi), o Infliximab (Remicade). Los pacientes elegibles son típicamente resistentes (sin respuesta) a al menos uno de los siguientes tratamientos: después de 1 mes de antibióticos (por ejemplo, ciprofloxacina, metronidazol); y/o después

30 de 3 meses de inmunosupresores (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina); y/o de inducción o mantenimiento de terapias anti-TNF (por ejemplo, infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab) a una dosis estable.

35

En una forma de realización el paciente es resistente a tratamiento a un inmunosupresor (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina) y un inhibidor de TNF- α (por ejemplo, infliximab o adalimumab).

Un paciente típico, por tanto, tiene enfermedad de Crohn luminal no activa ($CDAI \leq 220$) diagnosticada durante al menos seis meses, con una fístula perianal compleja que tiene 1 o 2 aberturas internas y 2 o 3 aberturas externas, que ha mostrado respuesta inadecuada a una o más de antibióticos, inmunosupresores o terapias anti-TNF. Una fístula con 1 o 2 aberturas internas y 3 aberturas externas es muy compleja y hasta ahora ha sido muy difícil de tratar. En una forma de realización, en el momento del tratamiento según la invención, el paciente recibe (a) ninguna terapia anti-TNF y ninguna terapia inmunosupresora, o (b) tanto una terapia anti-TNF como una terapia inmunosupresora. Es especialmente sorprendente que las eASC sean capaces de mejorar significativamente la remisión combinada (en la semana 24) en pacientes que reciben tanto terapia anti-TNF como inmunosupresora, que son las mejores terapias actualmente disponibles (véase la figura 3C).

La fístula perianal compleja tiene al menos dos aberturas externas, por ejemplo 3 o más aberturas externas. Algunas fístulas pueden tener 4 o 5 aberturas externas.

La fístula perianal compleja típicamente tiene múltiples trayectos, al menos dos aberturas internas, o tres aberturas externas. La fístula puede opcionalmente comprender dos o tres de estas características, por ejemplo: múltiples trayectos y al menos dos aberturas internas; múltiples trayectos y tres aberturas externas; al menos dos aberturas externas y tres aberturas externas; o múltiples trayectos, al menos dos aberturas internas y tres aberturas externas. En una forma de realización, la fístula perianal compleja contiene no más de dos aberturas internas y tres aberturas externas, por ejemplo, la fístula consiste en 1 o 2 aberturas internas y 2 o 3 aberturas externas (por ejemplo, 1AI/2AE, 1AI/3AE, 2AI/2AE o 2AI/3AE).

Después de la administración de las eASC, los pacientes se pueden tratar opcionalmente con antibióticos durante no más de 4 semanas. Se pueden mantener los inmunosupresores y anti-TNF a dosis estables a lo largo del tratamiento, por ejemplo, hasta la respuesta, remisión clínica o remisión combinada.

Los pacientes que no habían recibido tratamiento previo para enfermedad de Crohn fistulizante perianal, incluyendo antibióticos, y los que se sometieron a cirugía previa para la fístula activa diferente de drenaje o colocación de setón típicamente se excluyen. Los pacientes son típicamente no elegibles para el tratamiento si han recibido glucocorticoesteroides en las 4 semanas inmediatamente antes del tratamiento con eASC.

Se puede permitir un ciclo de esteroides para tratar exacerbación o enfermedad luminal durante el seguimiento con una dosis inicial de 40 mg controlada durante un máximo de 12 semanas.

5 En ciertas formas de realización, por ejemplo, en donde la primera administración de células es insuficiente, el método puede comprender además una administración adicional de las eASC. Esta administración adicional puede comprender: (c) administrar una segunda dosis de al menos aproximadamente 20×10^6 células, al menos aproximadamente 30×10^6 , o al menos aproximadamente 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo, 10 por ejemplo, aproximadamente 120 millones de células, por ejemplo, en una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la invención, al agujero interno (opcionalmente cerrado suturado) y las paredes de la fístula.

En algunas formas de realización, un método para tratar una fístula perianal compleja 15 resistente en un sujeto comprende: (a) cerrar el agujero interno con una sutura que comprende eASC alogénicas. Tales suturas recubiertas con células en las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo objeto se describen en detalle en la solicitud de patente en EE UU No. 11/056.241, presentada el 14 de febrero, 2005, que se incorpora al presente documento mediante referencia.

20 Los métodos pueden, en algunas formas de realización, además comprender: raspado profundo de al menos un trayecto de fístula; y/o rellenar dicho trayecto de fístula con un material. En ciertas formas de realización, el método puede comprender además administrar al menos aproximadamente 10×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo, 25 por ejemplo, de una composición celular objeto, al material. Típicamente, el material es un polímero o adhesivo basado en fibrina, tal como un pegamento o gel de fibrina. En ciertas formas de realización, la dosis de al menos aproximadamente 10×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo ya está abarcada en el material, por ejemplo, de modo que el material comprende la composición que contiene células madre estromales 30 derivadas de tejido adiposo.

En una forma de realización adicional, un método de tratar una fístula en un sujeto comprende:

- 35 (i) raspado profundo de al menos un trayecto de fístula
(ii) cerrar el agujero interno del trayecto raspado con una sutura

- (iii) administrar aproximadamente 120 millones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo expandidas alogénicas a una abertura interna (opcionalmente cerrada suturada) y las paredes de la fístula

5 por ejemplo, en una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo de la invención.

Una administración adicional de células no se requiere y opcionalmente se puede excluir. Sin embargo, en ciertas formas de realización, el método puede comprender además:

- 10 (iv) administrar una segunda dosis de al menos aproximadamente 20×10^6 células, al menos aproximadamente 30×10^6 , o al menos aproximadamente 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, aproximadamente 120 millones de eASC, típicamente a una abertura interna cerrada suturada, por ejemplo, en una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido
- 15 adiposo de la invención.

El paso (i) típicamente se lleva a cabo raspando en profundidad todos los trayectos de fístula que se van a tratar, por ejemplo, se introduce una aguja de legrado en el trayecto de la fístula, y se produce una hemorragia inducida raspando las paredes de la fístula para

20 obtener fibrina natural que llenará el trayecto de la fístula. Estudios clínicos previos por los inventores sugieren que la fibrina natural producida por este método de raspado es una opción preferida comparada con el uso de selladores de fibrina artificial, por tanto, en una forma de realización preferida del método de la invención, los trayectos fistulares no se rellenan con tal material.

25

El paso (iv) se lleva a cabo por administración local de las células, por ejemplo, una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo, por inyección en las paredes de la fístula a lo largo del trayecto de la fístula. Por ejemplo, múltiples inyecciones de 10 millones de células a lo largo de 3 cm de trayecto de fístula.

30

Se puede acceder a la fístula para reparación quirúrgica a través del cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante incisión, catéter, etc.

Los métodos descritos anteriormente pueden comprender además administrar un agente

35 terapéutico al sujeto que se trata, por ejemplo, por vía sistémica o local en el sitio de sutura. En ciertas formas de realización, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo

se formulan en una composición que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo que contiene un agente terapéutico, como se ha descrito anteriormente. En otras formas de realización, el agente terapéutico se administra por separado, por ejemplo, simultáneamente con los métodos, antes de que el método se realice, o después del que el método se realice. En algunas formas de realización, el agente terapéutico se administra al sujeto antes, durante y después de que se realicen los métodos en el sujeto. Los agentes terapéuticos ejemplares se han descrito anteriormente. En formas de realización preferidas, se administran al sujeto agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Los agentes terapéuticos para la enfermedad de Crohn ejemplares son agentes antiinflamatorios tal como agentes que comprenden mesalamina, agentes inmunosupresores tal como 6-mercaptopurina y azatioprina; agentes biológicos tal como infliximab (Remicade®), antibióticos, y agentes antidiarreicos tal como difenoxilato, loperamida y codeína.

Se puede requerir tratamiento de apoyo. Por ejemplo, se pueden administrar inmunosupresores antes, durante y/o después del tratamiento para prevenir la EICH, según métodos conocidos en la técnica. Antes de la administración, las células también se pueden modificar para suprimir una reacción inmunitaria del sujeto a las células o viceversa, según los métodos conocidos en la técnica.

La dosis de cualquier agente terapéutico variará dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno que se va a tratar o prevenir, la vía de administración, y la forma del agente. Cualquiera de las formulaciones objeto se puede administrar en una única dosis o en dosis divididas. Las dosis para los agentes terapéuticos se pueden determinar fácilmente por técnicas que conocen los expertos en la materia o como se enseña en el presente documento. Además, se pueden administrar mezclas de más de un agente terapéutico, o administrar múltiples agentes terapéuticos en composiciones separadas.

El tiempo preciso de administración y la cantidad de cualquier agente particular que dará el tratamiento más eficaz en un paciente determinado dependerá de la actividad, farmacocinética, y biodisponibilidad de un compuesto particular, estado fisiológico del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad, estado físico general, respuesta a una dosis determinada y tipo de medicación), vía de administración, y similares. Las directrices presentadas en el presente documento se pueden usar para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinar el tiempo óptimo y/o cantidad de administración, que no requerirá más

que experimentación rutinaria consistente en seguimiento del sujeto y ajustar la dosis y/o cadencia.

5 Mientras el sujeto se trata, se puede seguir la salud del paciente midiendo una o más de las señales relevantes a tiempos predeterminados durante un periodo de 24 horas. Se pueden optimizar el tratamiento, incluyendo suplemento, cantidades, tiempos de administración y formulación, según los resultados de tal seguimiento. El paciente se puede reevaluar periódicamente para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros, la primera de tal reevaluación típicamente se produce al final de cuatro semanas desde el inicio de la terapia, y las reevaluaciones posteriores se producen cada cuatro a ocho 10 semanas durante la terapia y después cada tres meses después de ello. La terapia puede seguir durante varios meses o incluso años, siendo un mínimo de un mes una duración típica de terapia para seres humanos. Se pueden hacer ajustes a la(s) cantidad(es) de agente administrado y posiblemente al tiempo de administración basado en estas 15 reevaluaciones.

La remisión combinada de la fístula ejemplificada en el presente documento comprende remisión tanto clínica como radiológica. La evaluación radiológica de remisión típicamente se lleva a cabo por IRM, que es una técnica bien conocida. Se pueden usar alternativamente 20 otras técnicas de imagenología, por ejemplo, ecografía endorrectal. Estas técnicas de imagenología evalúan la existencia de abscesos o acumulaciones.

El tratamiento se puede iniciar con dosis más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después de ello, la dosis se puede aumentar en pequeños 25 incrementos hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo.

El uso combinado de varios agentes terapéuticos puede reducir la dosis requerida para cualquier componente individual porque el inicio y duración del efecto de los diferentes componentes puede ser complementario. En tal terapia combinada, los diferentes agentes 30 activos se pueden administrar juntos o por separado, y simultáneamente o a tiempos diferentes en el día.

Se pueden determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos objeto por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, 35 por ejemplo, para determinar la DL_{50} y la DE_{50} . Se prefieren composiciones que muestran índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden usar compuestos que muestran efectos

secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija los agentes al sitio deseado para reducir los efectos secundarios.

5 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis de cualquier agente terapéutico o alternativamente de cualquier componente en el mismo, está típicamente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para agentes de la presente
10 invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una inhibición semimáxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa
15 dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

5. Respuesta y remisión clínica

20 Las eASC alogénicas de la invención son sorprendentemente eficaces en tratar fístulas perianales complejas resistentes en pacientes con enfermedad de Crohn. El criterio de valoración principal, remisión combinada en la semana 24, se cumple estadísticamente; Cx601 es estadísticamente superior al placebo. Ambos criterios de valoración secundarios clave, remisión y respuesta clínica en la semana 24, cumplen significación estadística límite
25 ($p=0,064$ & $p=0,054$ en la población ITT; $p=0,057$ & $0,045$ en la población mITT, respectivamente).

Los datos indican que los pacientes que reciben una única administración de eASC tienen una posibilidad el 30% mayor de alcanzar remisión clínica que el placebo. Los datos también
30 indican que los pacientes que reciben eASC tienen una posibilidad aproximadamente el 35% mayor de alcanzar una respuesta clínica que placebo.

En ciertas formas de realización, la remisión clínica se alcanza en 24 semanas, típicamente en 18 semanas. La remisión clínica se puede alcanzar en 12 semanas, o menos, por
35 ejemplo, en 10 semanas, o en 8 semanas. La remisión clínica se puede opcionalmente alcanzar después de 6 semanas. Los datos muestran que la mediana de tiempo a la

remisión clínica es aproximadamente 2 veces más corto con Cx601 que placebo (6,7 semanas frente a 14,6 semanas). Según esto, en una forma de realización, la remisión clínica se alcanza en 14 semanas.

- 5 En algunas formas de realización, la remisión combinada se alcanza en 24 semanas, típicamente en 18 semanas. La remisión combinada se puede alcanzar en 12 semanas, o menos, por ejemplo, en 10 semanas, o en 8 semanas. La remisión combinada se puede opcionalmente alcanzar después de 6 semanas.
- 10 En ciertas formas de realización, la respuesta clínica se alcanza en 11 semanas o menos. Los datos muestran que la mediana de tiempo a la respuesta clínica es también aproximadamente 2 veces más corto que placebo (6,3 semanas frente a 11,7 semanas). El tiempo a la respuesta clínica puede, en ciertas formas de realización, ser 10 semanas o menos, 9 semanas o menos, 8 semanas o menos. El tiempo a la respuesta clínica puede ser opcionalmente 7 semanas o menos, por ejemplo, aproximadamente 6 semanas.
- 15

Estos resultados son particularmente sorprendentes cuando se advierte que estas mejoras se observan después de una única administración de eASC.

- 20 El índice de actividad de enfermedad perianal "PDAI" comprende cinco categorías: escapes, dolor, restricción de actividad sexual, tipo de enfermedad perianal y grado de induración. Cada categoría se gradúa en una escala de cinco puntos, que varía desde sin síntomas (puntuación 0) a síntomas graves (puntuación 4). Se observa una mejora en la puntuación del índice de actividad de enfermedad perianal que es significativamente mayor para eASC que placebo en las semanas 6, 12 y 18. Por tanto, en ciertas formas de realización, se alcanza una mejora en el PDAI en 6 semanas, en 12 semanas o en 18 semanas. La mejora en PDAI puede opcionalmente ser una mejora de más de 1,5 puntos PDAI, opcionalmente al menos dos puntos PDAI. La mejora en PDAI puede opcionalmente ser una disminución (mejora) en cada uno de los cinco componentes en el índice.
- 25

30

6. Kits

- En otras formas de realización, la invención contempla kits que incluyen las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo y opcionalmente instrucciones para su uso. Los kits que comprenden las composiciones farmacéuticas y biomateriales de la presente invención también están dentro del ámbito de la invención. Los
- 35

componentes de kit pueden estar embalados para la práctica manual o parcial o completamente automatizada de los métodos anteriores. Tales kits pueden tener una variedad de usos, incluyendo, por ejemplo, terapia, reparación, preparación de biomateriales y otras aplicaciones.

5

Ejemplificación

Habiéndose descrito ahora la invención en general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente para fines de ilustración de ciertos aspectos y formas de realización de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

10

Ensayo clínico de fase III

El presente estudio es el primer estudio de fase 3 controlado con placebo que evalúa la eficacia y seguridad de Cx601 sola o añadida a la terapia médica actual para fístulas perianales complejas resistentes a tratamiento en pacientes con enfermedad de Crohn.

15

En general, los resultados demuestran que las eASC alogénicas están indicadas para el tratamiento de fístula(s) perianal(es) compleja(s) en pacientes adultos con enfermedad de Crohn luminal no activa/moderadamente activa, cuando la(s) fístula(s) ha(n) mostrado una respuesta inadecuada a al menos una terapia convencional o biológica.

20

Métodos

25

Supervisión del estudio

Este estudio de fase 3, aleatorizado, con doble enmascaramiento, de grupos paralelos, controlado con placebo, (NCT01541579; EUDRACT 2011-006064-43) se realizó en 49 centros médicos en 7 países europeos e Israel desde julio de 2012 a julio de 2015. El protocolo fue aprobado por un comité de ética central o local. Todos los pacientes dieron consentimiento informado escrito.

30

El estudio fue diseñado e implantado por el Comité Directivo de ADMIRE (véase el apéndice suplementario). El patrocinador recogió los datos, que fueron analizados por el Departamento de Bioestadística de Chiltern International, y el patrocinador junto con el

35

Comité Directivo interpretaron los datos. Todos los autores tuvieron acceso completo a los datos, estuvieron de acuerdo con la decisión de enviar el manuscrito final para publicación, y garantizan la precisión e integridad de los datos descritos. El manuscrito fue redactado por el primer autor y todos los autores contribuyeron a posteriores borradores.

5

Pacientes

Los pacientes elegibles eran adultos de 18 años de edad o mayores, tenían enfermedad de Crohn luminal no activa o moderadamente activa durante ≥ 6 meses, definida por un índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) de $\leq 220^{A24}$, y tenían fístulas perianales complejas (definidas como uno o más de los siguientes: origen alto inter-, trans-, extra- o supra-esfintérico; ≥ 2 aberturas externas; o acumulaciones asociadas) con un máximo de 2 aberturas internas y 3 externas, que habían estado drenando durante ≥ 6 semanas antes de la inclusión. Se excluyeron pacientes si tenían fístulas rectovaginales, estenosis anal y/o rectal y/o proctitis grave aguda (definida por la presencia de úlceras superficiales o profundas), estomas divergentes, o un absceso o acumulaciones > 2 cm que no se resolvieron por el procedimiento de preparación quirúrgica. Los pacientes elegibles tenían que ser resistentes a al menos uno de los siguientes tratamientos documentados como sin respuesta después de 1 mes de antibióticos (ciproflaxina, metronidazol) y/o después de 3 meses de inmunosupresores (aztioprina, 6-mercaptopurina) y/o de inducción o mantenimiento de terapias anti-TNF a una dosis estable. Los pacientes resistentes solo a antibióticos tenían que representar $< 25\%$ de la población total.

Después de la administración del producto de investigación, los pacientes pudieron ser tratados con antibióticos durante no más de 4 semanas. Se mantuvieron inmunosupresores y anti-TNF a dosis estables a lo largo del estudio. No se permitió el inicio o aumento de dosis de estos agentes.

Los pacientes que no habían recibido tratamiento previo para enfermedad de Crohn fistulizante perianal, incluyendo antibióticos, y los que se sometieron a cirugía previa para la fístula activa diferente de drenaje o colocación de setón también se excluyeron. Los pacientes no eran elegibles si recibieron glucocorticoides en las 4 semanas previas. Se permitió un ciclo de esteroides para tratar exacerbaciones de la enfermedad luminal durante el seguimiento con una dosis inicial de 40 mg controlada durante un máximo de 12 semanas

35

Aleatorización y tratamiento

Se realizó un escáner de IRM pélvico en la selección para guiar los procedimientos quirúrgicos y las acumulaciones se evaluaron por lectura enmascarada central. Además, los pacientes se sometieron a examen con anestesia, legrado de fístula, y colocación de setón según estuviera clínicamente indicado ≥ 2 semanas antes de la administración del producto de investigación (Fig. 1). Si se colocó un setón, se tuvo de retirar inmediatamente antes de la administración del producto de investigación.

Los pacientes se asignaron aleatoriamente en una proporción 1:1 a Cx601 o placebo después de la visita de preparación de la fístula ≥ 2 semanas antes de la administración del producto de investigación (Fig. 1). Los pacientes se estratificaron en base a la medicación concomitante en la aleatorización (anti-TNF y/o inmunosupresores o ninguno). Los tratamientos se asignaron usando una lista de aleatorización preestablecida generada por el Departamento de Bioestadística, Linical.

Los pacientes en el brazo Cx601 recibieron una única inyección de 120 millones de Cx601 por vía intralesional distribuidos en trayectos de fístula. El aislamiento y expansión de Cx601 se realizó como se ha descrito previamente^{A23}. Los pacientes en el brazo de placebo recibieron un volumen idéntico de solución salina. Los tratamientos del estudio se administraron con una aguja fina, larga después de retirar el/los setón(es), si estaban presentes, y legrado de la fístula. La mitad de la dosis se inyectó en el tejido que rodea la(s) abertura(s) interna(s) suturada(s). La otra mitad se inyectó en las paredes de la fístula (no más profundo de 2 mm) a lo largo del/de los trayecto(s) de la fístula, haciendo varias microburbujas.

No fue posible el enmascaramiento de los tratamientos ya que la suspensión de células era claramente diferente a la solución salina. El diseño de estudio con doble enmascaramiento se mantuvo siendo administrado el tratamiento por un cirujano conocedor del tratamiento y un gastroenterólogo y radiólogo sin conocerlo evaluando la respuesta.

30

Procedimientos de estudio y seguimiento

El cierre de la fístula se evaluó clínicamente en las semanas 6, 12, 18 y 24 por el investigador que examina la presencia de drenaje espontáneo y después de ejercer compresión con el dedo ligera en las aberturas externas tratadas^{A12}, y se evaluó radiológicamente por escáner IRM pélvico de lectura central, enmascarado en la semana 24;

se proporcionaron figuras a los lectores centrales para identificar las fístulas tratadas, pero no conocían los datos de los pacientes, orden de exámenes y tratamiento recibido. Se evaluaron sucesos adversos emergentes del tratamiento (TEAT) en todas las visitas de estudio. La gravedad de la enfermedad de Crohn perianal se evaluó en el punto inicial y en todas las visitas de estudio con el índice de actividad de enfermedad perianal (PDAI)^{A25}. Se evaluó la calidad de vida con el cuestionario de enfermedad intestinal inflamatoria (IBDQ)^{A26} en el punto inicial y la semana 24 como fue CDAI^{A24}.

Criterios de valoración de eficacia y seguridad

El criterio de valoración principal fue remisión combinada en la semana 24 definido como la evaluación clínica de cierre de todas las aberturas externas tratadas que estaban drenando en el punto inicial, y ausencia de acumulaciones >2 cm de las fístulas perianales tratadas en ≥ 2 o 3 dimensiones, confirmado por lectura de IRM central enmascarada (Bioclinica GmbH, Múnich, Alemania). La evaluación clínica de cierre se definió como ausencia de drenaje a pesar de ejercer compresión con el dedo ligera^{A12}.

Hubo dos criterios de valoración de eficacia secundarios clave: remisión clínica (es decir, cierre de todas las aberturas externas tratadas que estaban drenando en el punto inicial a pesar de ejercer compresión con el dedo ligera) y respuesta (es decir, cierre del $\geq 50\%$ de todas las aberturas externas que estaban drenando en el punto inicial) en la semana 24. Otros criterios de valoración de eficacia secundarios incluían tiempo a remisión clínica, tiempo a respuesta, puntuaciones PDAI, CDAI y IBDQ hasta la semana 24.

Los TEAE se codificaron según el Diccionario Médico para Actividades reguladoras, versión 17.0.

Análisis estadístico

El tamaño de muestra planeado para ser cribado era 278 pacientes para aleatorizar ≥ 208 pacientes (104 a cada grupo). El tamaño de la muestra era suficiente para seleccionar una diferencia mínima del 25% en el porcentaje de pacientes con remisión combinada entre Cx601 y placebo (las tasas de remisión combinada mínima anticipada eran del 50% para Cx601 y del 25% para placebo^{A8, A12, A23, A27}) con un error alfa de 0,025 y poder el 80%, y permitir que un 20% de los pacientes abandonara el estudio.

Los análisis de eficacia se realizaron en la población de intención de tratar (ITT) que incluía todos los pacientes aleatorizados, la población de intención de tratar modificada (mITT) que incluía todos los pacientes aleatorizados que recibieron tratamiento de estudio y tenían ≥ 1 evaluación de eficacia tras el punto inicial, y la población por protocolo (PP) que incluía todos los pacientes tratados sin desviaciones del protocolo principales. Se analizaron los TEAE en la población de seguridad definida como todos los pacientes que recibieron tratamiento de estudio.

El criterio de valoración principal se analizó usando una prueba de Cochran-Mantel-Haenszel estratificada, ajustando para estratos de aleatorización (es decir, tratamientos de la enfermedad de Crohn en la aleatorización). El análisis principal se hizo usando la población ITT. También se proporcionan resultados para la población mITT ya que su definición se parece más a la población ITT en otros ensayos clínicos aleatorizados y proporciona una estimación más precisa de los efectos de tratamiento. Los datos que faltan se imputaron usando el método de la última observación realizada (LOCF). Se imputó una no respuesta/no remisión si no se hizo en la semana 24 un escáner IRM tras el punto inicial o una evaluación clínica. También se imputó una no respuesta/no remisión si un suceso de rescate tuvo lugar antes de la semana 24. Los efectos de los sucesos de rescate y las convenciones de datos sobre eficacia ausentes se exploraron en análisis de sensibilidad del criterio de valoración principal.

Para abordar el problema de la multiplicidad, los dos criterios de valoración secundarios clave (remisión y respuesta clínica en la semana 24) se agruparon en una familia a corto plazo, con un método de filtros usando un procedimiento de prueba de Hochberg^{A28} para controlar el error de tipo I global, actuando el criterio de valoración de eficacia primario como el filtro. Se evaluó la significación estadística con un nivel de error de tipo I bilateral de 0,05. No se hizo ajuste estadístico para multiplicidad para los criterios de valoración secundarios no clave. Los porcentajes y diferencias de tratamiento se expresaron con intervalos de confianza (IC) del 95% calculados con un método asintótico de Wald. Se analizaron el tiempo a remisión y respuesta clínica con estimaciones de Kaplan-Meier. Los desenlaces de seguridad se presentaron con estadística descriptiva.

Se usó el sistema SAS v9.1.3 o posterior para análisis estadístico (SAS INstitute Inc., Cary, NC, EE UU).

Resultados

Se cribaron un total de 289 pacientes, y de estos, 212 se aleatorizaron a Cx601 o placebo (Fig. 2). Las características de los dos grupos en el punto inicial eran similares (Tabla 1). La mayoría de los pacientes habían recibido ≥ 1 tratamiento para la enfermedad de Crohn en los últimos 6 meses. Una mayor proporción de pacientes en el grupo Cx601 tenía fístulas de trayecto múltiple comparados con el grupo de placebo (46,6% y 30,4%, respectivamente). Un total de 171 pacientes (80,7%) completaron el seguimiento de 24 semanas. Durante el estudio, 1 paciente en el grupo de Cx601 y 4 pacientes en el grupo de placebo recibieron esteroides para exacerbación de la enfermedad de Crohn.

10

Eficacia

Una proporción significativamente mayor de pacientes tratados con Cx601 alcanzaron el criterio de valoración principal de remisión combinada en la semana 24 frente a placebo en las poblaciones ITT (49,5% y 34,3%, respectivamente; diferencia [IC al 97,5%]: 15,2% [0,2–30,3]; $p=0,024$) y mITT (51,5% y 35,6%; 15,8% [0,5–31,2]; $p=0,021$; Fig. 3A y B). Estos resultados se confirmaron en las poblaciones PP y en análisis de sensibilidad adicionales (tabla S1). El efecto de Cx601 fue mayor que el placebo en los 4 estratos de aleatorización, observándose los efectos numéricamente mayores de Cx601 en pacientes que recibieron ninguna o terapias tanto anti-TNF como inmunosupresoras en la aleatorización (diferencia de tratamiento 33,1% y 20,0%, respectivamente; Fig. 3C).

20

En la población mITT, una proporción numéricamente mayor de pacientes en el grupo de Cx601 frente a placebo alcanzó remisión clínica (55,3% y 42,6%, respectivamente; diferencia [IC del 95%]: 12,8% [-0,8–26,4]; $p=0,057$) y tuvieron una respuesta (68,9% y 55,4%, respectivamente; 13,5% [0,3–26,7] $p=0,045$) en la semana 24.

25

La mediana de tiempo a la remisión clínica fue aproximadamente 2 veces más corto con Cx601 frente a placebo (6,7 [IC del 95%, 6,4–11,9] semanas y 14,6 [11,9–22,9] semanas), como fue la mediana de tiempo a respuesta (6,3 [6,0–6,6] semanas y 11,7 [6,7–12,9] semanas).

30

La mejora en PDAI con Cx601 en la población mITT era significativamente mayor que con placebo en las semanas 6 (diferencia de cambio del tratamiento en el punto inicial [IC del 95%]: -1,0 [-1,7 a -0,3]), semana 12 (-1,2 [-2,0 a -0,4]), y semana 18 (-1,2 [-2,0 a -0,3]), pero

35

no en la semana 24 (-0,8 [-1,8 a 0,2]). Para las puntuaciones IBDQ y CDAI totales y de subdominios, no hubo diferencias significativas entre grupos de tratamiento (tabla S2).

Seguridad

5

El porcentaje de pacientes en los grupos de Cx601 y placebo que experimentaron TEAE fue similar (66,0% y 64,7%, respectivamente; tabla 2). Los TEAE más comúnmente descritos fueron proctalgia, absceso anal y nasofaringitis. Una mayor proporción de pacientes en el grupo de placebo frente a Cx601 experimentaron TEAE relacionados con el tratamiento (29,4% y 17,5%, respectivamente), los más comunes de los cuales fueron absceso anal y proctalgia. La mayoría de los TEAE eran leves o moderados de intensidad. Pocos pacientes se retiraron del estudio debido a TEAE (4,9% y 5,9%), mientras que una proporción ligeramente mayor de pacientes en el grupo de Cx601 experimentó TEAE graves (17,5% y 13,7%). El TEAE grave más común fue absceso anal (Cx601: 8,7%, placebo: 6,9%). No hubo muertes.

15

Discusión y visión global

Este es el primer estudio clínico a gran escala, aleatorizado, controlado con placebo del tratamiento de fístulas perianales resistentes a terapia complejas en pacientes con enfermedad de Crohn. En la población de pacientes del estudio difícil de tratar que tenían fístulas perianales complejas y que habían fracasado terapia convencional o biológica, 1 de cada 2 pacientes tratados con Cx601 solas o añadidas a la terapia médica actual alcanzaron remisión clínica y radiológica combinada en la semana 24. Este resultado era consistente a través de todas las poblaciones estadísticas, a pesar de que los pacientes en el grupo Cx601 tenían más fístulas de múltiples trayectos. Por tanto, los resultados del estudio muestran que Cx601 ofrece a pacientes resistentes a tratamiento una primera alternativa de cierre real para fístulas perianales complejas a los enfoques de cirugía radical.

25

El criterio de valoración primario de remisión clínica y radiológica combinada es más riguroso que el usado en otros estudios clínicos aleatorizados de tratamientos para fístulas perianales en enfermedad de Crohn, que típicamente han evaluado la respuesta clínica (es decir, $\geq 50\%$ de reducción en el número de fístulas drenantes) o remisión clínica^{A8, A12}. Este es el primer ensayo clínico a gran escala aleatorizado que usa evaluación clínica de cierre de fístulas y evaluación por IRM de ausencia de abscesos como recomiendan las directrices de la Organización Europea de Crohn y Colitis^{A29}.

35

Los análisis de eficacia secundarios refuerzan el beneficio clínico de Cx601. Con Cx601, el tiempo a remisión y respuesta clínica fue rápido, produciéndose en la mitad del tiempo que en el grupo de placebo. La diferencia en las tasas de remisión clínica entre los grupos de Cx601 y placebo no alcanzó significación estadística debido a un efecto “placebo” considerablemente mayor (42,6%) que el esperado y observado en estudios previos (13-19%)^{A8, A12, A27}. Los efectos del placebo según estratos aleatorizados (es decir, mayor con anti-TNF e inmunosupresores concomitantes [46,7%] y menor con ningún tratamiento [21,1%]) sugiere que el mayor efecto placebo en este estudio puede haber estado impulsado por el uso de medicación concomitante. El drenaje quirúrgico y el cierre de orificios internos también puede haber aumentado la respuesta al placebo. Mientras que se vieron mejoras beneficiosas en puntuaciones PDAI en el grupo Cx601, no hubo diferencias en las puntuaciones IBDQ y CDAI entre grupos de tratamiento. Esto fue probablemente debido al bajo CDAI (un criterio de inclusión) y alto IBDQ en el punto inicial.

Los datos de seguridad muestran que Cx601 se toleró bien en la población del estudio de acuerdo con los resultados del estudio de fase 1/2a anterior^{A23}. Los TEAE relacionados con tratamiento se produjeron más frecuentemente en el grupo de placebo y así se puede relacionar con el curso natural de la enfermedad o procedimientos de estudio quirúrgicos. El perfil de seguridad favorable puede representar una ventaja sobre terapias anti-TNF que se asocian con varios problemas de seguridad serios resultantes de inmunogenicidad al fármaco y un riesgo aumentado de infecciones, incluyendo tuberculosis^{A30, A31}.

Los resultados de este estudio son alentadores, considerando la necesidad para nuevas opciones de tratamiento eficaces y bien toleradas para pacientes con enfermedad de Crohn y fístulas perianales complejas. Este estudio también tiene implicaciones fundamentales para el cuidado de pacientes con enfermedad de Crohn con fístulas perianales complejas resistentes a tratamiento, ya que muchos de ellos deben someterse actualmente a cirugía repetida con el riesgo de dañar los músculos esfintéricos produciendo incontinencia fecal. Como resultado, el 12-38% de los pacientes con enfermedad fistulizante perianal requieren proctectomía^{A32}. En contraste, la administración de Cx601 es mínimamente invasiva y se puede realizar en un marco ambulatorio.

Las limitaciones de este ensayo fueron la exclusión de pacientes con más de 2 aberturas internas y 3 externas, así como esos con cirugía previa diferente de drenaje y colocación de

setón. Además, no se estableció si los TEAE estaban relacionados con el procedimiento quirúrgico.

5 En conclusión, Cx601 es una terapia eficaz y segura para fístulas perianales complejas en enfermedad de Crohn que fracasó a responder a tratamientos convencionales y/o biológicos.

Tabla 1. Características de los pacientes (población de seguridad)

Variable	Cx601 (N=103)	Placebo (N=102)
Edad – Años	38,9 (13,1)	37,6 (13,2)
Sexo masculino – no. (%)	57 (55,3)	54 (52,9)
Etnia – no. (%)		
Blanco	96 (93,2)	93 (91,2)
Negro	4 (3,9)	1 (1,0)
Otro	0	1 (1,0)
Falta	3 (2,9)	7 (6,9)
Peso – kg	73,3 (14,4)	71,4 (15,0)
Duración EC– años	11,8 (9,8)	11,4 (9,0)
Medicación EC anterior en los últimos 6 meses – no. (%)		
Antibióticos	78 (75,7)	72 (70,6)
Inmunosupresores	87 (84,5)	74 (72,5)
Anti-TNF	80 (77,7)	82 (80,4)
Medicación de EC concomitante (factor de estratificación) – no. (%)		
Anti-TNF	36 (35,0)	32 (31,4)
Inmunosupresores	16 (15,5)	21 (20,6)
Anti-TNF + inmunosupresores	27 (26,2)	30 (29,4)
Ninguno	24 (23,3)	19 (18,6)
Índice de actividad de la enfermedad de Crohn perianal*	6,7 (2,5)	6,5 (2,9)
Aberturas de fístula – no. (%)		
0 interna + 1 externa	0	1 (1,0)

1 interna + 1 externa	55 (53,4)	70 (68,6)
1 interna + 2 externa	23 (22,3)	17 (16,7)
1 interna + 3 externa	4 (3,9)	3 (2,9)
2 interna + 1 externa	3 (2,9)	2 (2,0)
2 interna + 2 externa	14 (13,6)	8 (7,8)
2 interna + 3 externa	4 (3,9)	1 (1,0)
Índice de actividad de la enfermedad de Crohn†	87,8 (48,3)	92,5 (55,3)
Cuestionario de enfermedad intestinal inflamatoria‡	173,5 (31,6)	169,8 (36,2)
Proteína C reactiva – mg/l	7,9 (11,5)	6,3 (9,5)
Hemoglobina – mmol/l	8,3 (0,8)	8,3 (0,8)

EC, enfermedad de Crohn; Cx601, células madre derivadas de tejido adiposo, expandidas, alogénicas; TNF, factor de necrosis tumoral.

Los datos son medias (desviación estándar) a menos que se especifique otra cosa.

*Las puntuaciones para el índice de actividad de la enfermedad de Crohn perianal pueden variar de 0 a 20; las puntuaciones mayores indican enfermedad más grave.

† Las puntuaciones para el índice de actividad de la enfermedad de Crohn pueden variar de 0 a 600; las puntuaciones mayores indican enfermedad más grave.

‡ Las puntuaciones para el cuestionario de enfermedad intestinal inflamatoria pueden variar de 32 a 224; puntuaciones mayores indican mejor calidad de vida.

10

Tabla 2. Sucesos adversos emergentes de tratamiento hasta la semana 24 (población de seguridad)

TEAE – no. (%)	Cx601 (N=103)	Placebo (N=102)
Global	68 (66,0)	66 (64,7)
TEAE que producen retirada del estudio	5 (4,9)	6 (5,9)
TEAE graves	18 (17,5)	14 (13,7)
TEAE en ≥5,0% pacientes*		
Proctalgia	13 (12,6)	11 (10,8)
Absceso anal	12 (11,7)	13 (12,7)
Nasofaringitis	10 (9,7)	5 (4,9)
Diarrea	7 (6,8)	3 (2,9)
Dolor abdominal	4 (3,9)	6 (5,9)
Fístula	3 (2,9)	6 (5,9)
TEAE relacionados con tratamiento	18 (17,5)	30 (29,4)
TEAE relacionados con tratamiento en ≥2,0% pacientes*		

Absceso anal	6 (5,8)	9 (8,8)
Proctalgia	5 (4,9)	9 (8,8)
Dolor de procedimiento	1 (1,0)	2 (2,0)
Escape de la fístula	1 (1,0)	2 (2,0)
Induración	0	2 (2,0)

TEAE, suceso adverso emergente de tratamiento; Cx601, células madre derivadas de tejido adiposo, expandidas, alogénicas; * en cada grupo de tratamiento.

5 **Tabla S1.** Análisis de apoyo y sensibilidad para criterio de valoración principal: remisión combinada*

Tipo de análisis	Conjunto de análisis	Detalles de manejo de datos que faltan	Cx601 (%)	Placebo (%)	Diferencia (%) (IC al 97,5%)	Valor p
Apoyo	ITT	No respuesta/no remisión imputado para todos los datos que faltan y después de terapia de rescate (no LOCF)	48,6	32,4	16,2 (1,3–31,1)	0,014
Apoyo	PP1†	LOCF aplicado No respuesta/no remisión se imputa después de terapia de rescate	57,0	36,9	20,1 (3,3–36,9)	0,010
Apoyo	PP2‡	No respuesta/no remisión se imputa después de terapia de rescate	63,2	39,7	23,4 (5,6–41,3)	0,005
Sensibilidad	ITT	Faltan = no respuesta/no remisión después de LOCF aplicado. Medicación de rescate no considerada como fallo	49,5	34,3	15,2 (0,2–30,3)	0,024
Sensibilidad	ITT	Faltan = no respuesta/no remisión después de LOCF aplicado. Análisis logístico	49,5	34,3	NA	0,017

incluyendo factor de
estratificación y número
de aberturas externas
basales como factores

IC, intervalo de confianza; Cx601, células madre derivadas de tejido adiposo, expandidas, alogénicas; ITT, intención de tratar; LOCF, última observación realizada; NA, no aplicable; PP, por protocolo; TNF, factor de necrosis tumoral.

La terapia de rescate se define como corticoides a 40 mg de equivalente de prednisona durante ≥ 12 semanas; nuevo anti-TNF comparado con terapia basal durante ≥ 8 semanas; nuevo inmunosupresor comparado con terapia basal durante ≥ 12 semanas; o intervención quirúrgica para la fístula tratada.

* Evaluación clínica de cierre de todas las aberturas externas tratadas que estaban drenando en el punto inicial, y la ausencia de acumulaciones > 2 cm de las fístulas perianales tratadas en ≥ 2 de 3 dimensiones en evaluación por IRM centralmente enmascarada en la semana 24. La evaluación clínica de cierre se definió como drenaje a pesar de ejercer compresión suave con el dedo.

† La población PP1 incluye esos sin desviaciones de protocolo principales (Cx601, n=86; placebo, n=84).

‡ La población PP2 incluye pacientes PP1 que completaron la visita de la semana 24 (Cx601, n=76; placebo, n=73).

Tabla S2. Desenlaces descritos por pacientes de puntuaciones del índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI)* y el cuestionario de la enfermedad intestinal inflamatoria (IBDQ)† hasta la semana 24 (población mITT).

CDAI	Cx601 (N=103)	Placebo (N=101)	Diferencia de tratamientos (IC al 95%)
Total			
Basal	87,8 (48,3)	93,3 (55,0)	
Semana 24	92,5 (66,5)	94,1 (76,1)	
Cambio del basal	5,7 (62,2)	2,2 (65,5)	1,8 (-16,0 a 19,7)
No. Heces líquidas			
Basal	9,8 (12,3)	9,3 (9,4)	
Semana 24	9,5 (12,6)	10,0 (12,6)	
Cambio del basal	-0,0 (9,5)	0,9 (10,7)	-0,7 (-3,4 a 2,1)
Dolor abdominal			

ES 2 681 774 A1

Basal	1,6 (2,9)	2,0 (3,1)	
Semana 24	2,7 (4,5)	3,0 (4,1)	
Cambio del basal	1,1 (4,4)	0,9 (4,0)	-0,1 (-1,2 a 1,1)
Bienestar general			
Basal	2,7 (3,7)	3,2 (4,1)	
Semana 24	3,1 (4,6)	3,3 (4,7)	
Cambio del basal	0,6 (4,5)	0,3 (4,5)	0,1 (-1,1 a 1,3)

IBDQ	Cx601 (N=103)	Placebo (N=101)	Diferencia de tratamiento (IC al 95%)
Total			
Basal	173,5 (31,6)	169,4 (36,1)	
Semana 24	178,3 (34,6)	174,7 (36,2)	
Cambio del basal	3,8 (25,5)	4,0 (25,6)	0,3 (-6,6 a 7,3)
Función intestinal			
Basal	57,1 (9,2)	56,6 (9,9)	
Semana 24	57,2 (10,2)	56,4 (9,8)	
Cambio del basal	0,0 (7,6)	-0,6 (8,2)	0,5 (-1,6 a 2,7)
Estado emocional			
Basal	62,9 (14,5)	61,4 (15,2)	
Semana 24	64,7 (15,6)	63,9 (15,3)	
Cambio del basal	1,7 (11,3)	2,1 (11,2)	-0,3 (-3,3 a 2,7)
Síntomas sistémicos			
Basal	25,8 (5,2)	24,9 (6,5)	
Semana 24	26,2 (5,9)	25,6 (6,3)	
Cambio del basal	0,3 (4,7)	0,6 (5,1)	-0,1 (-1,4 a 1,2)
Función social			
Basal	27,7 (6,9)	26,5 (8,4)	
Semana 24	29,5 (7,3)	28,4 (8,0)	
Cambio del basal	1,6 (6,4)	1,7 (6,0)	0,3 (-1,3 a 2,0)

IC, intervalo de confianza; Cx601, células madre derivadas de tejido adiposo, expandidas, alogénicas; mITT, intención de tratar modificada.

Los datos son medias (desviación estándar).

* Las puntuaciones para el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CAI) pueden variar de 0 a 600; las puntuaciones mayores indican enfermedad más grave.

† Las puntuaciones para el cuestionario de enfermedad intestinal inflamatoria (IBDQ) pueden variar de 32 a 224; puntuaciones mayores indican mejor calidad de vida

5

Las formas de realización de la invención incluyen:

1. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso en un método de tratar una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn.
2. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según la forma de realización 1, en donde la fístula comprende uno, dos o tres de: múltiples trayectos, dos aberturas internas y tres aberturas externas.
3. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según la forma de realización 1 o la forma de realización 2, en donde la fístula es resistente a uno o más de (i) antibióticos, (ii) inmunosupresores y (iii) terapia anti-TNF.
4. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde el paciente recibe ninguna o ambas terapias anti-TNF y terapia de inmunosupresores.
5. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde el paciente (a) tiene enfermedad de Crohn no activa o moderadamente activa; y/o (b) enfermedad de Crohn luminal.
6. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde las células se inyectan por vía intralesional.
7. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde se administran 120 millones de células en una única administración.
8. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde la terapia induce remisión combinada o remisión clínica.
9. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según la forma de realización 8, en donde la remisión combinada o la remisión clínica se alcanza en 24 semanas, en 18 semanas o en 12 semanas.

10. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según la forma de realización 9, en donde la remisión combinada o la remisión clínica se alcanza en 8 semanas o en 6 semanas.
- 5 11. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde la fístula se sigue por IRM.
- 10 12. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas expresan los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105.
- 15 13. Células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas para uso según cualquiera de las formas de realización precedentes, en donde menos de aproximadamente el 5% de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas expresan los marcadores de superficie HLAII, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86.
- 20 14. Uso de células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas en la fabricación de un medicamento para tratar fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn.
- 25 15. Un método de tratar una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn, en un paciente en necesidad de tal tratamiento, que comprende el paso de administrar células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas a la fístula.
- 30 16. Un uso según la forma de realización 14 o un método según la forma de realización 15, que comprende además las características de cualquiera de las formas de realización 2 a 13.

Referencias

- 30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinantes e inmunología, que están dentro de las capacidades de la técnica. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y
- 35 Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. patente en

EE UU No: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984);
 Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal
 Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press,
 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In
 5 Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.
 H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology,
 Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology
 (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental
 Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the
 10 Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en el presente documento, incluyendo
 esos artículos enumerados a continuación, se incorporan al presente documento mediante
 referencia en su totalidad como si se indicara que cada publicación o patente individual se
 15 incorpora específica e individualmente mediante referencia. En caso de conflicto, la presente
 solicitud, incluyendo cualquier definición en el presente documento, controlará.

1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Perianal Crohn's
 Disease. *Gastroenterology* (2003) 125:1503-1507.
- 20 2. Levy C, Tremaine WJ. *Inflamm Bowel Dis* (2002) 8(2):106-11.
3. Pennincke F, D'Hoore A, Filez L. *Acta Gastroenterol Belg* (2001) 64(2):223-226.
4. Rius J, Nessim A, Nogueras JJ, Wexner SD. *Eur J Surg* (2000) 166(3):218-222.
5. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. *Plastic Reconstr Surg*
 (2002) 109(1): 199-209.
- 25 6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. *Tissue Eng* (2001) 7(2): 211-228.
7. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Gomez-Garcia L et al. *Int J Colorectal Dis* (2003) 18:
 451-454.
8. Abkowitz JL. *New Engl J Med* (2002) 346(10): 770-772.
9. Matsubara H. *Lancet* (2004) 363:746-747.
- 30 10. Cowan CM, Shi YY, Aalami 00, et al. *Nat Biotechnol.* (2004) 22(5):560-7
11. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo MA. *New Eng J Med* (2003) 349: 1480-1481.
12. Osawa M., Hanada K., Hanada H. y Nakauchi H. (1996) *Science* 273, 242-245.
13. Morrison S.J., Uchida N. y Weissman I.L. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 35-71.
14. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J. A., Moore K.A., Lemischka* I.R.

- (2002) *Science* 298, 601-604.
15. Phillips RL. (2000) *Curr Top Microbiol Immunol.* 251, 13-19.
16. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) *Science* 298, 597-600.
- 5 17. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary, AAlfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003) *Cells Tissues Organs* 174 (3), 101-109.
18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, *Exp Hematol.* Sep (1976);4(5):267-74.
19. Caplan AI *J Orthop Res.* Sep (1991);9(5):641-50
- 10 20. Pittenger, M.F. et al. (1999) *Science* 284: 143-147
21. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME, *J Cell Sci.* Jun (1992);102 (Pt 2):341-51
22. Yoo JU, Johnstone B, *Clin Orthop.* Oct (1998); (355 Supl):S73-81
23. Wakitani S. et al. (1995) *Muscle Nerve* 18: 1417-1426.
- 15 24. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, *Bone.* 1992;13(1):81-8.
25. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, *Exp Neurol.* Agosto (2000);164(2):247-56.
26. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr, *Am Surg.* Mar 20 (1995);61(3):231-6.
27. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, *Exp Hematol.* Agosto (2002);30(8):896-904.
28. Caplan AI, Bruder SP, *Trends Mol Med.* Jun (2001);7(6):259-64.
29. Stanford, C.M. et al. (1995) *J Biol Chem* 270: 9420-9428.

25

Referencias "A"

- A1. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;380:1590-605.
- A2. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002;122:875-80.
- 30 A3. Eglinton TW, Barclay ML, Gearry RB, Frizelle FA. The spectrum of perianal Crohn's disease in a population-based cohort. *Dis Colon Rectum* 2012;55:773-7.

- A4. Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmstrom B. Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease. *Gut* 1980;21:525-7.
- A5. Scharl M, Rogler G. Pathophysiology of fistula formation in Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014;5:205-12.
- 5 A6. Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OO. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2009;6:92-106.
- A7. Bell SJ, Williams AB, Wiesel P, Wilkinson K, Cohen RC, Kamm MA. The clinical course of fistulating Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1145-51.
- A8. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, et al. Infliximab maintenance therapy for
10 fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004;350:876-85.
- A9. Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, et al. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:17-24.
- A10. Present DH, Korelitz BI, Wisch N, Glass JL, Sachar DB, Pasternack BS. Treatment of
15 Crohn's disease with 6-mercaptopurine. A long-term, randomized, double-blind study. *N Engl J Med* 1980;302:981-7.
- A11. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn disease. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995;123:132-42.
- A12. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in
20 patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-405.
- A13. Domenech E, Hinojosa J, Nos P, et al. Clinical evolution of luminal and perianal Crohn's disease after inducing remission with infliximab: how long should patients be treated? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:1107-13.
- A14. Goldstein ES, Marion JF, Present DH. 6-Mercaptopurine is effective in Crohn's disease
25 without concomitant steroids. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:79-84.
- A15. Korelitz BI, Present DH. Favorable effect of 6-mercaptopurine on fistulae of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:58-64.
- A16. Brandt LJ, Bernstein LH, Boley SJ, Frank MS. Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology* 1982;83:383-7.
- 30 A17. Solomon MJ, McLeod RS, O'Connor BI, Steinhart AJ, et al. Combination ciprofloxacin and metronidazole in severe perianal Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1993;7:571-3.
- A18. Molendijk I, Nuij VJ, van der Meulen-de Jong AE, van der Woude CJ. Disappointing durable remission rates in complex Crohn's disease fistula. *Inflamm Bowel Dis*
35 2014;20:2022-8.

- A19. Gecse K, Khanna R, Stoker J, et al. Fistulizing Crohn's disease: Diagnosis and management. *United European Gastroenterol J* 2013;1:206-13.
- A20. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011;6:457-78.
- 5 A21. DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:978-83.
- A22. Garcia-Olmo D, Guadalajara H, Rubio-Perez I, Herreros MD, De La Quintana P, Garcia-Arranz M. Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells.
10 *World J Gastroenterol* 2015;21:3330-6.
- A23. de la Portilla F, Alba F, Garcia-Olmo D, Herrerias JM, Gonzalez FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis* 2013;28:313-23.
- 15 A24. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-44.
- A25. Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* 1995;20:27-32.
- 20 A26. Guyatt G, Mitchell A, Irvine EJ, et al. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989;96:804-10.
- A27. Colombel JF, Schwartz DA, Sandborn WJ, et al. Adalimumab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gut* 2009;58:940-8.
- A28. Hochberg Y. A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance.
25 *Biometrika* 1988;75:800-2.
- A29. Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis* 2010;4:63-101.
- A30. Schwartz DA, Herdman CR. Review article: The medical treatment of Crohn's perianal
30 fistulas. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:953-67.
- A31. American Gastroenterological Association medical position statement: perianal Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;125:1503-7.
- A32. Geltzeiler CB, Wieghard N, Tsikitis VL. Recent developments in the surgical management of perianal fistula for Crohn's disease. *Ann Gastroenterol* 2014;27:320-
35 30.

Equivalentes

La presente invención proporciona, entre otras cosas, métodos y composiciones para tratar y prevenir fístula. Mientras que se han discutido formas de realización específicas de la invención objeto, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la invención serán aparentes para los expertos en la materia tras la revisión de esta especificación. No se pretende que las reivindicaciones adjuntas reivindiquen todas de tales formas de realización y variaciones, y el ámbito total de la invención se debe determinar por referencia a las reivindicaciones, junto con su ámbito total de equivalentes, y la especificación, junto con tales variaciones.

REIVINDICACIONES

1. Uso de células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene enfermedad de Crohn, en donde:
 - (i) la fístula comprende múltiples trayectos;
 - (ii) se administran 120 millones de células al paciente en un único procedimiento; y
 - (iii) la terapia induce remisión clínica en 8 semanas.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde la fístula comprende 2 aberturas internas.
3. Uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la fístula comprende 2 o 3 aberturas externas.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la terapia induce remisión clínica en 6 semanas.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la remisión clínica se sostiene hasta 24 semanas desde la terapia.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la terapia induce remisión combinada en 24 semanas, en 18 semanas, en 12 semanas, en 10 semanas, en 8 semanas, o en 6 semanas.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde una mejora en el índice de actividad de la enfermedad perianal (PDAI) se alcanza en 24 semanas, en 18 semanas, en 12 semanas, en 10 semanas, en 8 semanas, o en 6 semanas.
8. Uso según la reivindicación 7, en donde la mejora en PDAI es una mejora de más de 1,5 puntos PDAI.
9. Uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la mejora en PDAI es una mejora de al menos dos puntos PDAI.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fístula es resistente a uno o más de (i) antibiótico, (ii) inmunosupresor y (iii) terapia anti-TNF.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente recibe ninguna o ambas de una terapia anti-TNF y terapia de inmunosupresores.
- 5 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente:
(a) tiene enfermedad de Crohn no activa o moderadamente activa; y/o
(b) enfermedad de Crohn luminal.
- 10 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fístula se sigue por imagenología de resonancia magnética (IRM).
- 15 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas expresan los marcadores de superficie HLA I, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, y CD105.
- 20 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde menos de aproximadamente el 5% de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas expresan los marcadores de superficie HLAII, CD11b, CD11c, CD14, CD45, CD31, CD34, CD80 y CD86.

Figura 1. Diseño del estudio

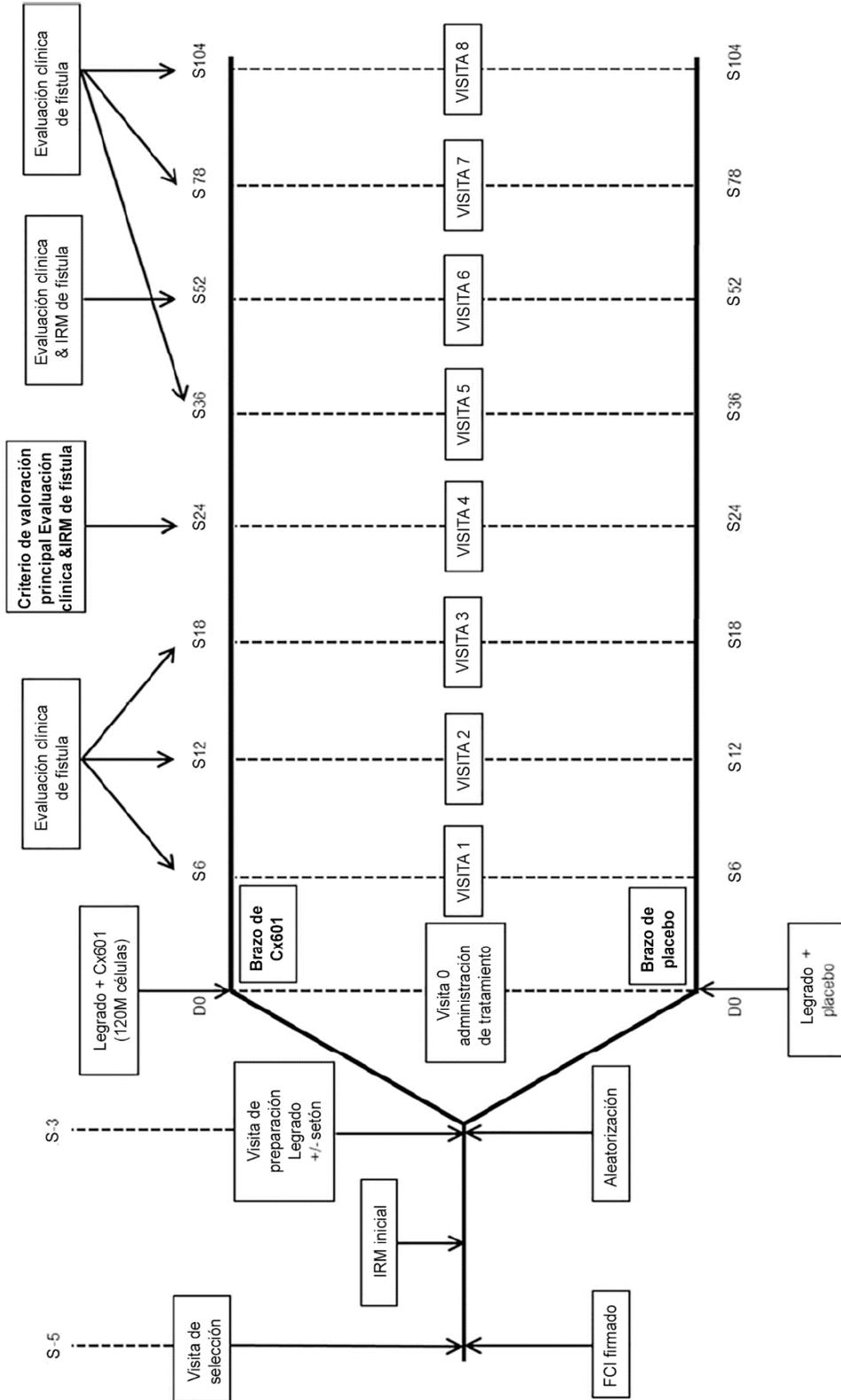


Figura 2. Destino de los pacientes

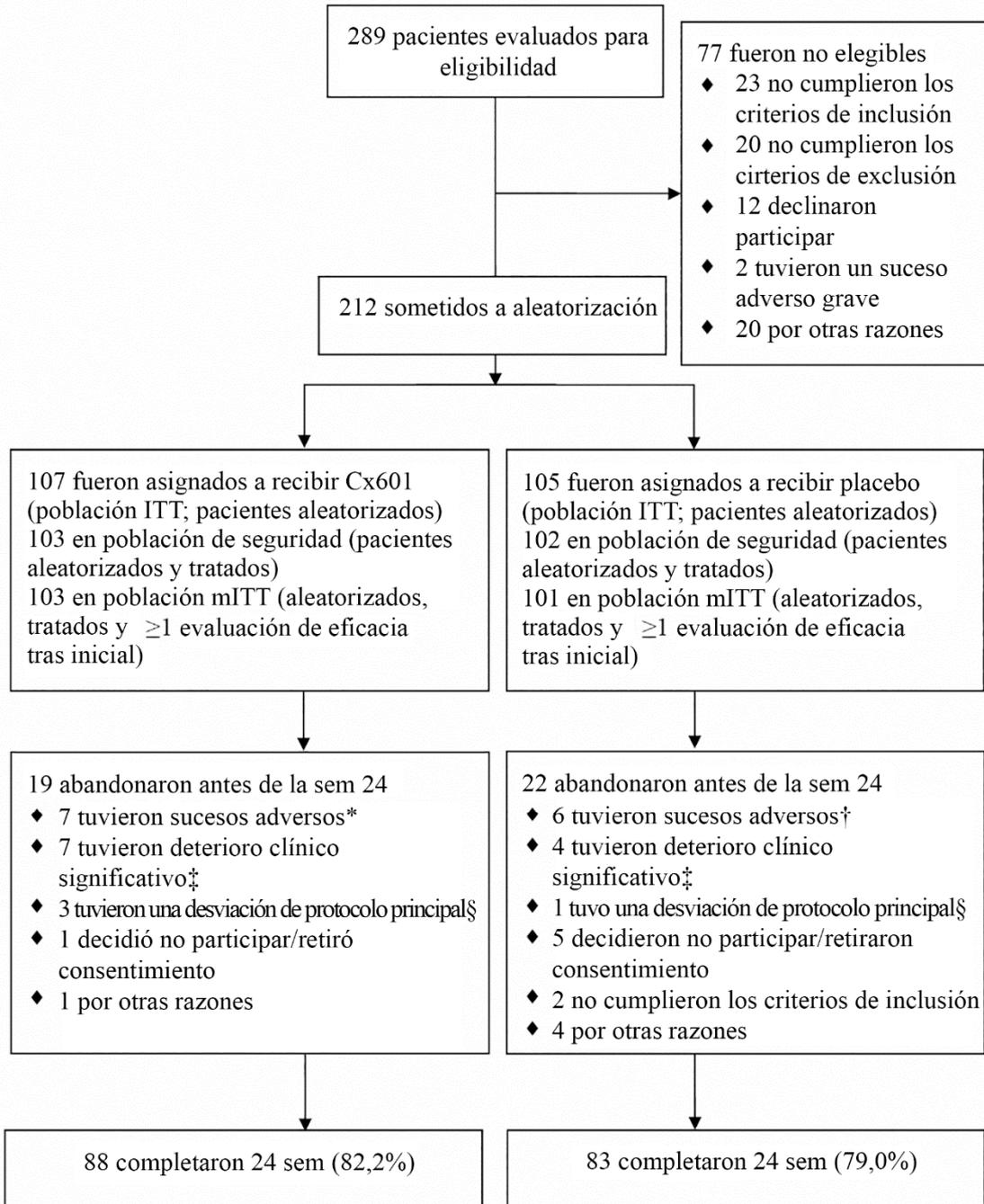


Figura 3. Criterio de valoración principal

Figura 3A

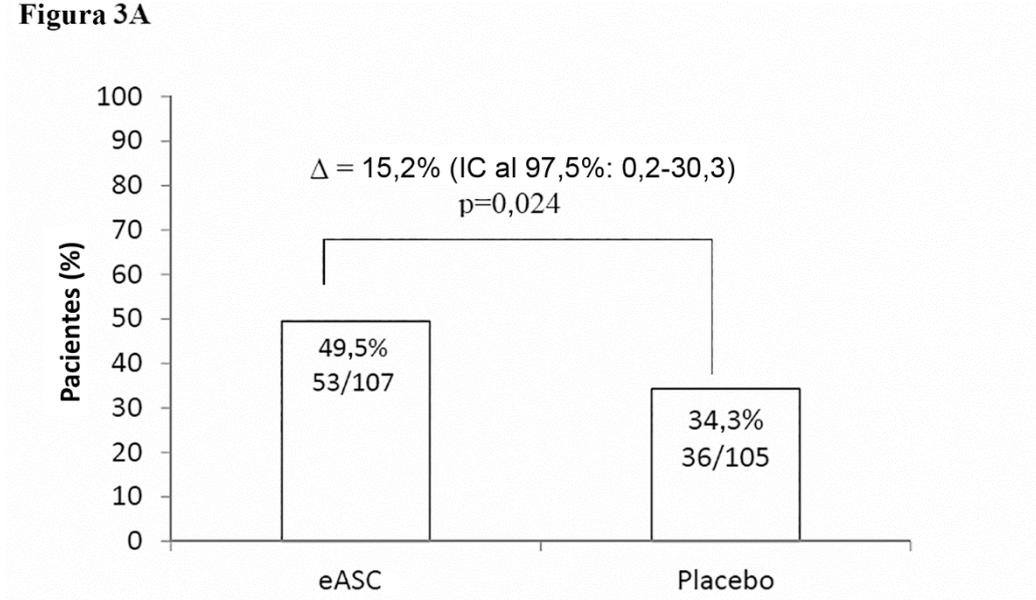


Figura 3B

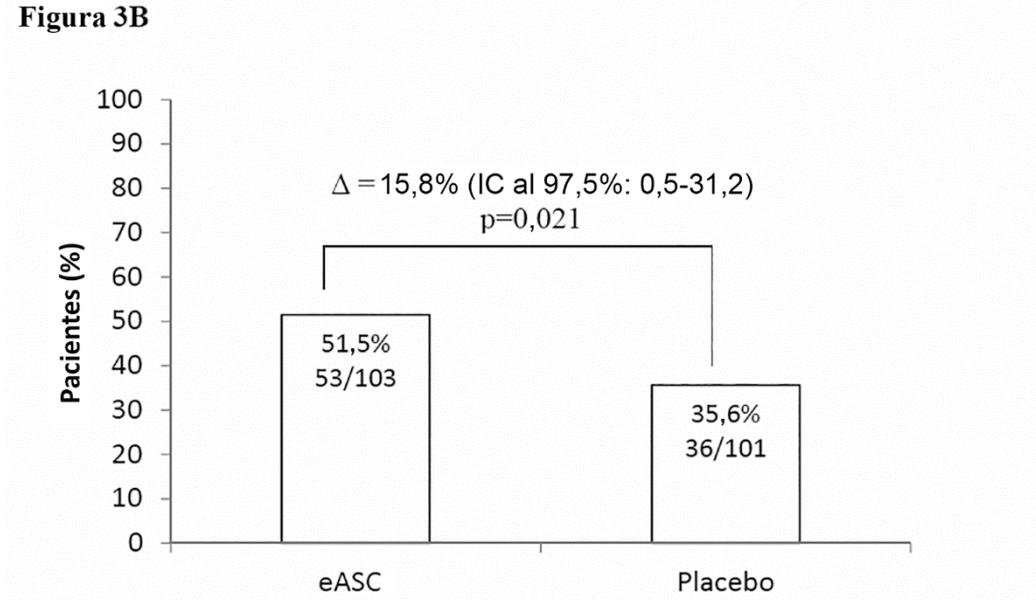
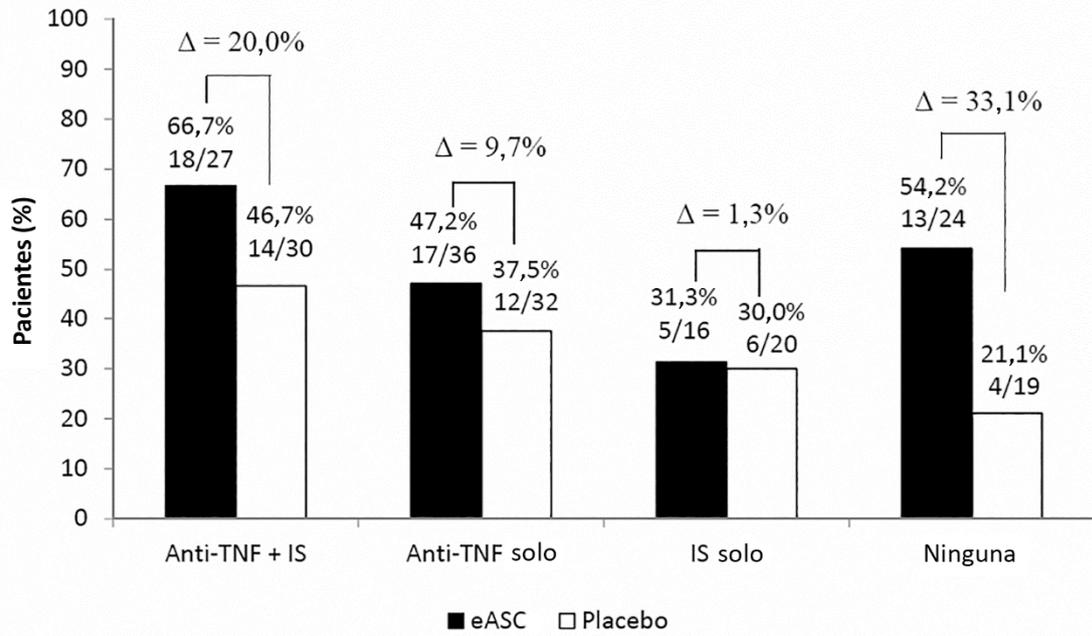


Figura 3C





- ②① N.º solicitud: 201700204
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.03.2017
 ③② Fecha de prioridad: **14-03-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K35/28** (2015.01)
A61P1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE LA PORTILLA F <i>et al.</i> Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eascs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn´s disease: results from a multicenter phase i/ii clinical trial. international journal of colorectal disease, 20130301 springer verlag, berlin, DE. 01/03/2013, Vol. 28, Nº 3, Páginas 313 - 323, ISSN 0179-1958, <DOI: doi: 10.1007/s00384-012-1581-9>. página 314, columna derecha, primero, segundo, tercer y quinto párrafos, columna izquierda cuarto párrafo; página 315, columna izquierda, primer y segundo párrafos; página 316, columna derecha, segundo, séptimo párrafos, columna izquierda, tercer párrafo; página 317, columna derecha, primer párrafo.	1-15
A	PARK K J <i>et al.</i> Allogeneic adipose-derived stem cells for the treatment of perianal fistula in Crohn´s disease: a pilot clinical trial. Colorectal Disease 20160501 Blackwell Publishing Ltd gbr. 01/05/2016, Vol. 18, Nº 5, Páginas 468 - 476, ISSN 1462-8910 (print) ISSN 1463-1318 (electronic), <DOI: doi:10.1111/codi.13223 pubmed:26603576>. página 469, columna izquierda, párrafo segundo y tercero; página 472, columna derecha, primer párrafo.	1-15
A	US 2012020937 A1 (LEE SUNG-KOO <i>et al.</i>) 26/01/2012, Párrafos [0033], [0092], [0094].	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.11.2017	Examinador Sonia González Peñalba	Página 1/6
---	---	----------------------



- ②① N.º solicitud: 201700204
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.03.2017
③② Fecha de prioridad: **14-03-2016**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K35/28** (2015.01)
A61P1/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2014140362 A2 (TIGENIX S A U <i>et al.</i>) 18/09/2014, Página 25, líneas 15-22, 34.	1-15
P,X	PANES JULIAN <i>et al.</i> Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. The Lancet, 20160729 The Lancet Publishing Group, GB. 29/07/2016, Vol. 388, N° 10051, Páginas 1281 - 1290, ISSN 0140-6736, <DOI: doi:10.1016/S0140-6736(16)31203-X>	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.11.2017

Examinador
Sonia González Peñalba

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, NPL, MEDLINE, EMBASE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DE LA PORTILLA F <i>et al.</i> expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eascs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn´s disease: results from a multicenter phase i/ia clinical trial. international journal of colorectal disease, 20130301 springer verlag, berlin, DE. Vol. 28, Nº 3, Páginas 313 - 323, ISSN 0179-1958, <DOI: doi:10.1007/s00384-012-1581-9>	01.03.2013
D02	PARK K J <i>et al.</i> Allogeneic adipose-derived stem cells for the treatment of perianal fistula in Crohn´s disease: a pilot clinical trial. Colorectal Disease 20160501 Blackwell Publishing Ltd gbr. Vol. 18, Nº 5, Páginas 468 - 476, ISSN 1462-8910 (print) ISSN 1463-1318 (electronic), <DOI: doi:10.1111/codi.13223 pubmed:26603576>	01.05.2016
D03	US 2012020937 A1 (LEE SUNG-KOO <i>et al.</i>)	26.01.2012
D04	WO 2014140362 A2 (TIGENIX S A U <i>et al.</i>)	18.09.2014
D05	PANES JULIAN <i>et al.</i> Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (cx601) for complex perianal fistulas in Crohn´s disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. The Lancet, 20160729 The Lancet Publishing Group, GB. Vol. 388, Nº 10051, Páginas 1281 - 1290, ISSN 0140-6736, <DOI: doi:10.1016/S0140-6736(16)31203-X>	29.07.2016

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTICULOS 6 Y 8 DE LA LP**

La presente solicitud de patente, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica y tal y como ha sido presentada en sus reivindicaciones 1-15, parece ser nueva y poseer actividad inventiva por no estar incluida en el estado de la técnica ni poder deducirse de éste de un modo evidente por un experto en la materia.

Se han encontrado documentos que hacen referencia al uso de células madre estromales derivadas del tejido adiposo alogénicas expandidas para el tratamiento de fístula perianal compleja resistente en pacientes con la enfermedad de Crohn.

Así, el documento D01, considerado el antecedente tecnológico más próximo al objeto definido en dichas reivindicaciones, describe el uso de células madre estromales derivadas del tejido adiposo alogénicas (página 314, columna derecha, párrafos primero y segundo) expandidas para el tratamiento de fístula perianal compleja resistente en un paciente que tiene la enfermedad de Crohn (véase resumen). La fístula comprende múltiples trayectorias (véase página 314, columna derecha, tercer párrafo). Se administraron inicialmente 20 millones de células y después de la semana 12 se llevó a cabo una administración adicional de 40 millones de células (véase página 316, columna derecha, segundo párrafo) y se observó remisión clínica a la semana 12 en algunos de los pacientes (véase página 316, columna izquierda, tercer párrafo y columna derecha séptimo párrafo). Los pacientes seleccionados para llevar a cabo las pruebas no recibieron terapia anti-TNF (véase página 314, columna derecha, tercer párrafo) ni terapia de inmunosupresión (véase página 314, columna derecha, primer párrafo). La fístula se siguió por resonancia magnética de imagen MRI (véase página 314, columna derecha, quinto párrafo). Las células se inyectaron intralesionalmente (véase página 315, columna izquierda, primer párrafo). Se produjeron cambios en el índice de la actividad de la enfermedad perianal PDAI (véase página 315, columna izquierda, segundo párrafo). El PADI disminuyó progresivamente con el tiempo en más del 37% en la semana 24 (véase página 317, columna derecha, primer párrafo). Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas expandidas expresan los marcadores de superficie HLA I y no expresan HLA II, CD40, DC80 y CD86 (véase página 314, columna izquierda, último párrafo).

La diferencia entre D01 y la presente solicitud de patente es que ésta última utiliza un régimen de dosificación diferente, esto es, una única dosis de 120 millones de células. El efecto técnico que produce esta diferencia es que administrando una única dosis de 120 millones de células se consigue una remisión de las fístulas en 8 semanas. Por lo que, teniendo en cuenta el estado de la técnica, no sería evidente para un experto en la materia dicho régimen de dosificación para la remisión de la fístula.

Por lo que la reivindicación 1 parece ser nueva y poseer actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.

Existen otros documentos que hacen, también, referencia al uso de células madre estromales derivadas del tejido adiposo alogénicas expandidas para el tratamiento de fístula perianal compleja resistente en pacientes con la enfermedad de Crohn en los que se administran distintas cantidades de células madre.

Por ejemplo, el documento D02, en donde se inyectan intralesionalmente 30 millones de células (véase página 469, columna izquierda, segundo y tercer párrafos). Además, el seguimiento de la fístula se lleva a cabo mediante MRI a la semana 8 del tratamiento pero no se observa remisión antes de la semana 12 (véase página 472, columna derecha, primer párrafo).

El documento D03 en el que la fístula es resistente a antibiótico, inmunosupresores y terapia anti TNF y se inyectan 20 millones de células intralesionalmente (véase párrafo [0092]) obteniéndose remisión de la fístula a las 2 semanas (véase párrafo [0094]). Además, las células expresan CD29, CD44, y CD105, entre otros, y no expresan CD34, CD45, entre otros (véase párrafo [0033]).

El documento D04 en el que se inyectaron intralesionalmente 20 millones de células y a la semana 12 se administraron adicionalmente 40 millones observándose remisión a partir de la semana 12 (véase página 25, líneas 15-22) y las fístulas se monitorizaron mediante MRI (véase página 25, línea 34).

Por consiguiente, la reivindicación 1 parece ser nueva y poseer actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.

Las restantes reivindicaciones 2-15 dependen directa o indirectamente de la primera y han de interpretarse como añadidas a ésta, por lo que también parecen tener novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.

Por lo tanto las reivindicaciones 1-15 parecen ser nuevas y poseer actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.