

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 825**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/EP2014/055282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140362**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14712628 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2972368**

54 Título: **Biomarcadores de linfocitos para determinar la respuesta clínica a la terapia celular**

30 Prioridad:

**15.03.2013 EP 13382091**

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

**18.03.2020**

73 Titular/es:

**TIGENIX, S.A.U. (50.0%)  
Parque Tecnológico de Madrid, C/ Marconi, 1  
28760 Tres Cantos (Madrid), ES y  
TIGENIX N.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE LA ROSA, OLGA;  
LOMBARDO, ELEUTERIO y  
DALEMANS, WILFRIED**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 748 825 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de linfocitos para determinar la respuesta clínica a la terapia celular

## 5 Antecedentes de la invención

Se han encontrado células madre mesenquimatosas adultas (a continuación en el presente documento también denominadas “MSCs” o “MSC”) en una variedad de tejidos adultos. Habiéndose identificado en primer lugar en la médula ósea, actualmente se acepta que las MSC residen en otros tejidos de origen mesodérmico: tejido adiposo, placenta, cordón umbilical, pulpa dental, cápsula sinovial. A pesar de amplios esfuerzos, no se han identificado marcadores de superficie individuales exclusivos para las MSC. Las MSC se definen según los tres criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular: a) adhesión al plástico: las MSC pueden aislarse mediante adhesión al plástico y expandirse *in vitro* en medio que contiene suero sin requisitos adicionales para factores de crecimiento o citocinas; b) expresión de una combinación específica de marcadores de superficie: las MSC son negativas para marcadores hematopoyéticos y endoteliales tales como CD11b, CD14, CD31, CD34 y CD45, y positivas para una variedad de otros marcadores, incluyendo HLA de clase I, CD73, CD90 y CD105; c) potencial de diferenciación: las MSC pueden identificarse *in vitro* mediante su capacidad para diferenciarse para dar células de tipo mesenquimatoso (por ejemplo, diferenciación para dar trilineaje en adipocitos, osteoblastos y condrocitos). Las MSC son al menos tripotentes en las etapas tempranas, lo que puede reducirse a, por ejemplo, células bipotentes o unipotentes en el transcurso de procesos de expansión *in vitro*. Aunque comparten estas principales características, pueden encontrarse diferencias entre las MSC de fuentes diferentes. Por consiguiente, el secretoma difiere entre los tipos de células, y las MSC derivadas de médula ósea (BM-MSC) y las MSC derivadas de tejido adiposo (ASC) muestran perfiles de expresión específicos de ARN y proteínas.

Las MSC se consideran una herramienta prometedora para terapia celular en medicina regenerativa, o para tratar otras enfermedades tales como enfermedades isquémicas, inflamatorias e inmunitarias. Aunque inicialmente se pensó que la diferenciación *in situ* era la base de sus propiedades terapéuticas (es decir, regeneración del tejido estructural), actualmente se cree que su capacidad inmunomoduladora y efectos paracrinos a través de factores tróficos con propiedades antifibróticas, antiapoptóticas o proangiogénicas son los mecanismos más probables de su efecto terapéutico.

Las MSC muestran propiedades de inmunomodulación y regulan la función (función de proliferación, de activación y efectora) de una amplia variedad de células inmunitarias incluyendo linfocitos B, T linfocitos, linfocitos T citotóxicos, células dendríticas derivadas de monocitos y neutrófilos. Los mecanismos moleculares y celulares específicos implicados en la actividad inmunorreguladora de las MSC todavía se encuentran en investigación pero se basan tanto en mecanismos dependientes del contacto celular (es decir, a través de interacción Jagged1-Notch1) como en efectos paracrinos a través de la liberación de factores solubles que incluyen factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformante (TGF) beta 1, indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), óxido nítrico (NO), interleucina (IL)-10, IL-6, hemo oxigenasa-1 (HO-1) o HLA-G5. Además, las MSC también pueden modular respuestas inmunitarias a través de la generación de células T reguladoras (Treg). Estas células se definen mediante la expresión de CD4, CD25 y el factor de transcripción Forkhead box p3 (Foxp3), y desempeñan un papel central en la protección contra la autoinmunidad a través de su capacidad inmunosupresora.

Además de esta capacidad inmunomoduladora, una posible ventaja adicional del uso clínico de MSC es que la inmunogenicidad de MSC se considera que es baja. Esto es debido al hecho de que la expresión de los HLA de clase I es baja, y los HLA de clase II y las moléculas coestimuladoras clásicas CD40, CD80 y CD86 no son detectables.

Uno de los primeros ensayos clínicos informados (1995) que implicaba MSC fue la terapia con células progenitoras estromales derivadas de la médula ósea en el tratamiento de pacientes que tenían neoplasias hemáticas. Desde entonces, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos y se han otorgado las primeras autorizaciones de comercialización para las terapias con MSC. Actualmente existen varios cientos de ensayos informados que implican MSC para el tratamiento de indicaciones que incluyen trastornos óseos (por ejemplo, quistes óseos, fisura palatina, osteonecrosis, artrodesis raquídea), trastornos de los cartílagos (por ejemplo, reparación del cartílago articular y reparación del menisco), trastornos hemáticos (por ejemplo, anemia, síndrome mielodisplásico), metabolopatías (por ejemplo, diabetes de tipo I y II), hepatopatías (por ejemplo, cirrosis e insuficiencia), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, AMI), trastornos digestivos (por ejemplo, IBD y fístula anal), trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn), neumopatías (por ejemplo, COPD e IPF), enfermedades neurológicas (por ejemplo, MS, accidente cerebrovascular y degeneración discal), nefropatías (por ejemplo, insuficiencia renal y trasplante renal), trastornos genitourinarios (por ejemplo, incontinencia urinaria y disfunción eréctil) y enfermedades oftalmológicas (por ejemplo, retinosis pigmentaria).

DelaRosa *et al.* (Current Opinion in Biotechnology, vol. 23, n.º 6, 2012, págs. 978-983) da a conocer que la eficacia del tratamiento con MSC depende del estado inmunitario y del entorno inflamatorio, lo que implica que cada paciente no responderá igualmente a la terapia con MSC, evocando la necesidad de distinguir a los pacientes que responden de los pacientes que no responden antes del (costoso) tratamiento. Krampera M *et al.* (Stem cells, vol. 24, n.º 2,

2006, págs. 386-398) enseña que la terapia con MSC funcionará mejor en un entorno de Th1, que se conoce que es rico en IFN- $\gamma$ , que se produce principalmente por células T CD8+ y linfocitos T citotóxicos y que ha aumentado los números de células T CD8+ (células efectoras citotóxicas). De manera implícita, los pacientes que tienen un estado caracterizado por un entorno de Th1, y por tanto un nivel de células T CD8+ aumentado, serán pacientes que responden. Krampera M *et al.* (Leukemia, vol. 25, n.º 9, 2011, págs. 1408-1414) describe que la EICH (enfermedad injerto contra huésped) puede prevenirse mediante las MSC (incluyendo las ADSC), y se refiere al estado inmunitario/inflamatorio del paciente.

Mientras que tales investigaciones en marcha ilustran el potencial de las células madre mesenquimatosas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos, el uso de biomarcadores para la predicción de la respuesta al tratamiento puede ayudar de manera potencial en el desarrollo y uso de tales terapias.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona marcadores basados en sangre novedosos para predecir la respuesta clínica a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la respuesta clínica a la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas en un paciente que padece una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario evaluando uno o más marcadores de linfocitos en el que dicho marcador de linfocitos es el nivel de linfocitos CD4+ y/o CD8+, en el que el paciente se clasifica como que responde si:

- (a) el paciente tiene un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55% de los linfocitos T totales;
- (b) el paciente tiene un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65% de los linfocitos T totales; o si
- (c) el paciente tiene una razón celular CD4:CD8+ igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento de un paciente humano que tiene una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario, en la que el paciente se selecciona para que responda a las células madre mesenquimatosas mediante el método tal como se define en el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55% de linfocitos T determinado mediante el método tal como se define en el primer aspecto de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65% de linfocitos T determinado mediante el método tal como se define en el primer aspecto de la invención.

En un último aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene una razón celular CD4:CD8 igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5 determinado mediante el método tal como se define en el primer aspecto de la invención.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: % de CD4 y % de CD8 en PBMC de pacientes en grupos que responden y que no responden en el nivel inicial.

Figura 2: razón CD4:CD8 en PBMC de pacientes en grupos que responden y que no responden en el nivel inicial.

Figura 3: expresión de HLA-II en PBMC de pacientes en el nivel inicial y PBMC del día 15 en grupos que responden y que no responden.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la presente descripción, se explicará a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención. Se incluirán definiciones adicionales a lo largo de la descripción según sea necesario.

5 Se entenderá que los términos “células madre”, “células estromales”, “células T reguladoras” y “células de fibroblasto” abarcan la progenie de las mismas, incluyendo, pero sin limitarse a, descendientes cultivados *ex-vivo* de las mismas. Se entenderá que las células de la progenie pueden obtenerse después de cualquier número de pases de la población parental. Sin embargo, en determinadas realizaciones, las células de la progenie pueden obtenerse  
10 después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pases de la población parental.

15 Se entenderá que el término “alogénico” tal como se usa en el presente documento significa de individuos diferentes de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos.

Se entenderá que el término “autólogo” tal como se usa en el presente documento significa del mismo individuo.

20 El término “trastornos autoinmunitarios” se refiere a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, tisular y/o de órgano provocada por una reacción inmunitaria del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. Los ejemplos ilustrativos no limitativos de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con los métodos o las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, miocardiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga  
25 crónica y disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 o mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, escleroderma, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjogren, síndrome de  
30 Goodpasture, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveitis, vasculitis tales como vasculitis de dermatitis herpetiforme, vitiligo, granulomatosis de Wegener, enfermedad antimembrana basal glomerular, síndrome antifosfolípido, enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso, fiebre mediterránea familiar, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, oftalmía simpática, poliendocrinopatías, psoriasis, etc.

45 Para los fines de la invención descrita en el presente documento, “trastornos inmunitarios” incluye enfermedades autoinmunitarias y enfermedades mediadas de manera inmunitaria tales como, pero no limitadas a, enfermedades inflamatorias mediada por el sistema inmunitarios.

50 El término “enfermedad inflamatoria” se refiere a un estado en un sujeto caracterizado por inflamación, por ejemplo inflamación crónica. Los ejemplos ilustrativos no limitativos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, enfermedad celíaca, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), asma, encefalitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteolisis inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), vasculitis inflamatoria (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegner, arteritis de Takayasu, arteritis temporal y granulomatosis linfomatoide), angioplastia vascular postraumática (por ejemplo, restenosis después de angioplastia), espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria, hepatitis crónica e inflamación crónica como resultado de infecciones virales o bacterianas crónicas.

55 El término “aislado” aplicado a una población celular se refiere a una población celular, aislada del cuerpo humano o animal, que está sustancialmente libre de una o más poblaciones celulares que se asocian con dicha población celular *in vivo* o *in vitro*. El término “CMH” (complejo mayor de histocompatibilidad) se refiere a un subconjunto de genes que codifica para proteínas que presentan antígenos de la superficie celular. En seres humanos, estos genes se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). En el presente documento, las abreviaturas CMH o HLA se usan de manera intercambiable. El término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata o un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

65 El término “inmunomodulador” se refiere a la inhibición o reducción de una o más actividades biológicas del sistema inmunitario que incluye, pero no se limita a, regulación por disminución de la respuesta inmunitaria y estados

- 5 inflamatorios así como cambios en los perfiles de citocinas, la actividad citotóxica y la producción de anticuerpos. El término “inmunomodulador específico de antígenos” se refiere a la inhibición o reducción de una o más actividades biológicas del sistema inmunitario asociadas con un antígeno o unos antígenos específicos, incluyendo tanto aloantígenos como autoantígenos. Se entenderá que el término “inmunomodulador específico de antígenos”.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que “negativo” o “-” tal como se usa con respecto a los marcadores de la superficie celular significa que, en una población celular, menos del 20%, el 10%, preferiblemente menos del 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1 % o ninguna de las células expresan dicho marcador. La expresión de los marcadores de la superficie celular puede determinarse, por ejemplo, por medio de citometría de flujo para un marcador de la superficie celular específico usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema de FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica).
- 15 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término “célula madre mesenquimatosa” (también denominada en el presente documento “MSC”) significa una célula estromal que puede dar lugar a múltiples tipos de células diferentes, originalmente derivadas del mesénquima. El término se refiere a una célula que puede diferenciarse para dar al menos una de un osteoblasto, condrocito, adipocito o miocito. Se entenderá que el término, tal como se usa en el presente documento, incluye la progenie de dicha MSC, por ejemplo, pero sin limitarse a, descendientes subcultivados de la misma.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que la expresión “expresión significativa” o sus términos equivalentes “positivo” y “+” cuando se usan en relación a un marcador de la superficie celular significa que, en una población celular, más del 20%, preferiblemente más del 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o incluso todas las células de las células expresan dicho marcador.
- 25 La expresión de los marcadores de la superficie celular puede determinarse, por ejemplo, por medio de citometría de flujo para un marcador de la superficie celular específico usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema de FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica) que muestra una señal para un marcador de la superficie celular específico en citometría de flujo por encima de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema de FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica). La señal de fondo se define como la intensidad de la señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar cada marcador de superficie en análisis de FACS convencional. Para un marcador que se considera positivo, la señal específica observada es más fuerte del 20%, preferiblemente más fuerte del 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 500%, el 1000%, el 5000%, el 10000% o por encima, que la intensidad de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema de FACS Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos comercialmente disponibles y protocolos convencionales conocidos en la técnica).
- 30 Además, pueden usarse anticuerpos monoclonales conocidos y comercialmente disponibles contra dichos marcadores de superficie celular (por ejemplo, receptores celulares y proteínas transmembrana) para identificar células relevantes.
- 35 El término “tejido conectivo” se refiere a un tejido derivado del mesénquima e incluye varios tejidos que se caracterizan porque sus células están incluidas dentro de la matriz extracelular. Los ejemplos de tejidos conectivos incluyen, pero no se limitan a, tejidos adiposos y cartilagosos.
- 40 Se entenderá que el término “fibroblasto”, tal como se usa en el presente documento, incluye células sinoviales similares a fibroblastos.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que los términos “tratar”, “tratamiento” y “que trata” cuando se usan directamente en referencia a un paciente o sujeto significan la administración de una composición farmacéutica a un sujeto que necesita dicho tratamiento para la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno (incluyendo, pero sin limitarse a, una enfermedad isquémica, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada de manera inmunitaria incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados).
- 50 Se entenderá que los términos “grado de respuesta clínica”, “respuesta clínica” y “respuesta al tratamiento” significan un cambio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno que incluyen, pero sin limitarse a, una enfermedad isquémica, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada de manera inmunitaria incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados, en el que dicho cambio resulta de la administración de una composición farmacéutica a un sujeto que necesita dicho tratamiento.
- 55 Se entenderá que el término “paciente que responde” significa un individuo, sujeto o paciente que tiene una enfermedad o un trastorno (incluyendo, pero sin limitarse a, una enfermedad isquémica, un trastorno inflamatorio,
- 60
- 65

una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada de manera inmunitaria incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados) en el que un tratamiento mitiga o mejora uno o más síntomas del mismo o de otra manera proporciona beneficio terapéutico en el que dicho cambio resulta de la administración de una composición farmacéutica a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

5 Se entenderá que el término “daño tisular”, tal como se usa en el presente documento, incluye tanto la lesión de tejidos blandos como la lesión de tejidos duros, y debe incluirse la fístula, por ejemplo, fístula anal, fístula rectovaginal, etc.

10 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que los términos “tratar” y “que trata” cuando se usan directamente en referencia a tejidos dañados significan la mejora de tal daño mediante tanto mecanismos directos tales como la regeneración de tejidos dañados, la reparación o el reemplazo de tejidos dañados (por ejemplo, mediante tejido cicatricial), así como a través de mecanismos indirectos, por ejemplo, reduciendo la inflamación permitiéndose así la formación de tejido.

15 El término “terapia de combinación” se refiere al uso de las composiciones farmacéuticas de la presente invención junto con otros agentes activos o modalidades de tratamiento, de la manera de la presente invención para la mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno incluyendo, pero sin limitarse a, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada de manera inmunitaria incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados. Estos otros agentes o tratamientos pueden incluir fármacos y terapias conocidos para el tratamiento de tales trastornos, tales como, pero sin limitarse a, corticosteroides y compuestos antiinflamatorios no esteroideos.

#### Métodos de pronóstico

25 La presente invención proporciona un método para predecir la respuesta al tratamiento para una terapia celular en pacientes que padecen una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario evaluando un marcador basado en sangre, preferiblemente linfocitos. En una realización preferida, dicha “terapia celular” es la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas. En una realización de la misma, dicho paciente es un sujeto humano que tiene una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario. Por consiguiente, la invención proporciona un método para predecir la respuesta clínica a la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas en un sujeto humano que tiene una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario. En una realización, el método comprende medir las poblaciones de linfocitos o células CD3+ en una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto humano y predecir del mismo el grado de respuesta clínica a la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas.

40 En una realización, el método comprende evaluar un marcador seleccionado del grupo que comprende el nivel de linfocitos CD4+, el nivel de linfocitos CD8+ y combinaciones de los mismos en una muestra de sangre obtenida de dicho sujeto humano y predecir del mismo el grado de respuesta clínica a la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas.

45 En una realización, la composición farmacéutica comprende células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre estromales o estromales multipotentes. En una realización, la composición farmacéutica comprende células madre mesenquimatosas derivadas del tejido adiposo.

50 En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide en PBMC de sujetos humanos. En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide en linfocitos de sujetos humanos. En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide en linfocitos CD3+ de sujetos humanos.

55 En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ puede determinarse como un % de la población de linfocitos total, un número de células o una razón.

En una realización, el marcador es el nivel de CD4+. En una realización adicional, un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55%, más preferiblemente del 40% al 50% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 35%; menos de aproximadamente el 40%; menos de aproximadamente el 45%; menos de aproximadamente el 50%; menos de aproximadamente el 55%) de células CD4+ dentro de la población de linfocitos T se asocia con un sujeto humano que se prevé que responda.

60 En una realización, el marcador es el nivel de CD8+. En una realización adicional, un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65%, más preferiblemente del 50%-60% (por ejemplo, más de aproximadamente el 45%; más de aproximadamente el 50%; más de aproximadamente el 55%; más de aproximadamente el 60%; más de aproximadamente el 65%) de células CD8+ dentro de la población de linfocitos T se asocia con un sujeto humano que se prevé que responda.

65 En una realización, el marcador es la razón celular CD4+:CD8+. En una realización adicional, una razón celular

CD4+:CD8+ igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5, lo más preferiblemente igual a o menor que 1 (por ejemplo, menos de aproximadamente 1,2; menos de aproximadamente 1,1; menos de aproximadamente 1; menos de aproximadamente 0,9; menos de aproximadamente 0,8; menos de aproximadamente 0,7; menos de aproximadamente 0,6) se asocia con un sujeto humano que se prevé que responda.

5 En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide antes de la administración de la composición farmacéutica. En una realización adicional, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide posterior a la administración de la composición farmacéutica. En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide al menos 1, 5, 10, 15 ó 20 días después de la administración de la composición farmacéutica. En una realización, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide tanto antes de como posterior a la administración de la composición farmacéutica. En otra realización, en la que la composición farmacéutica se administra una pluralidad de veces al paciente, el nivel de CD4+ o CD8+ se mide antes de y/o posterior a la administración de la composición farmacéutica.

#### 15 Usos médicos

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un sujeto humano.

20 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un sujeto humano en la que dicho sujeto humano tiene un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55%, más preferiblemente del 40% al 50% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 35%; menos de aproximadamente el 40%; menos de aproximadamente el 45%; menos de aproximadamente el 50%; menos de aproximadamente el 55%) de linfocitos T.

30 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un sujeto humano en la que dicho sujeto humano tiene un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65%, más preferiblemente del 50%-60% (por ejemplo, más de aproximadamente el 45%; más de aproximadamente el 50%; más de aproximadamente el 55%; más de aproximadamente el 60%; más de aproximadamente el 65%) de linfocitos T.

40 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un sujeto humano en la que dicho sujeto humano tiene una razón celular CD4+:CD8+ igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5, lo más preferiblemente igual a o menor que 1 (por ejemplo, menos de aproximadamente 1,2; menos de aproximadamente 1,1; menos de aproximadamente 1; menos de aproximadamente 0,9; menos de aproximadamente 0,8; menos de aproximadamente 0,7; menos de aproximadamente 0,6).

#### 45 Inmunofenotipado

Los métodos para la medición de poblaciones de linfocitos HLA-II+, CD4+ y CD8+ son bien conocidos en la técnica. El método de referencia para la cuantificación de dichas células es mediante citometría de flujo. Los paneles de tinción se encuentran comercialmente disponibles para la detección de etiquetas de fluorescencia de dichas poblaciones celulares de linfocitos. Normalmente, el % de cada subpoblación se determina mediante la tinción para el marcador específico dentro de la población de CD3. La conversión del % en recuentos celulares puede llevarse a cabo usando un enfoque volumétrico, o bien analizando un volumen fijo de muestra o bien registrando el volumen de cualquier muestra dada. Alternativamente, los sistemas basados en perlas permiten la conversión del % en recuentos celulares absolutos usando perlas fluorescentes para realizar adiciones conocidas de muestras y medir así el volumen de muestra. Los enfoques volumétricos o basados en perlas se denominan enfoques de plataforma única, y se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, TruCount (Beckton Dickinson) y FlowCoulter (Beckton Coulter). De manera adicional, también se encuentran disponibles plataformas dedicadas para el análisis de CD4+, por ejemplo, FACScount (Beckton Dickinson). Una metodología alternativa para la cuantificación de linfocitos es el uso de un analizador de hematología para la medición del recuento de linfocitos total como referencia para la medición por FACS. A menudo se denominan enfoques de "plataforma dual" a los enfoques tales como "Pan-leucogating", que son conocidos en la técnica para la cuantificación de sub-poblaciones de linfocitos usando el enfoque de plataforma combinada. Como una alternativa a la citometría de flujo, se conocen métodos manuales que usan un microscopía en combinación con hemocitómetros. Los kits comercialmente disponibles utilizan perlas inmunomagnéticas para el aislamiento de subpoblaciones celulares que pueden contarse posteriormente bajo el microscopio.

Composiciones farmacéuticas

5 En una divulgación, la composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células madre (preferiblemente células madre mesenquimatosas), células estromales, células T reguladoras, fibroblastos y combinaciones de los mismos (por ejemplo, células madre estromales o estromales multipotentes) y un portador farmacéutico. En una divulgación, la composición farmacéutica comprende células madre mesenquimatosas o estromales, más preferiblemente células madre mesenquimatosas o estromales derivadas de tejido adiposo.

10 En una divulgación, una composición farmacéutica comprenderá el número de células requerido para una dosis; los números de células adecuados por dosis son, por ejemplo, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 100 millones de células; entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 10 millones de células; entre aproximadamente 10.000 y aproximadamente 1 millón de células; entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 células; entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 10.000 células; entre aproximadamente 10.000 - 15 100.000 células; entre aproximadamente 100.000 - 1 millón de células; entre aproximadamente 1 millón - 10 millones de células; entre aproximadamente 10 millones - 100 millones de células.

Los portadores farmacéuticos adecuados se conocen en la técnica y son preferiblemente aquellos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de los EE.UU., o enumerados en la Farmacopea de los EE.UU., o Farmacopea Europea, u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, vehículo o soporte con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes de tamponamiento del pH. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E W Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad 25 profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador de manera que se proporciona la forma para la administración adecuada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración. En una divulgación preferida, las composiciones farmacéuticas son estériles y están en forma adecuada para la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto animal, más preferiblemente un sujeto mamífero, y lo más preferiblemente un sujeto humano. 30

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación semisólidas y líquidas, tales como preparaciones liofilizadas, disoluciones o suspensiones líquidas, disoluciones inyectables y que pueden infundirse, etc. La composición 35 farmacéutica es preferiblemente inyectable.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden combinarse con otras modalidades de tratamiento, por ejemplo, corticosteroides, compuestos antiinflamatorios no esteroideos u otros agentes útiles en el tratamiento de la inflamación. El uso combinado de los agentes del presente documento con estas otras terapias o modalidades de tratamiento pueden ser concurrentes, o administrarse de manera secuencial, es decir, los dos tratamientos pueden dividirse de tal forma que dichas terapias o composiciones farmacéuticas de la invención puede administrarse antes de o después de la otra terapia o modalidad de tratamiento. El médico tratante puede decidir sobre la secuencia apropiada de administración de las células inmunomoduladoras, o una 40 composición farmacéutica que comprende las mismas, en combinación con otros agentes, terapias o modalidades de tratamiento. 45

Se prefiere que las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprendan células madre, células estromales, células T reguladoras y/o células de fibroblasto. Se prefiere particularmente que dichas células madre o estromales sean células madre mesenquimatosas (a continuación en el presente documento también denominadas MSC), lo más preferiblemente células madre derivadas de tejido adiposo (a continuación en el presente documento también denominadas ASC), que son células estromales multipotentes que se originan a partir de tejido adiposo, preferiblemente a partir de tejido adiposo humano (hASC). 50

Las MSC usadas en el método de la presente invención se derivan preferiblemente de tejido conectivo, lo más preferiblemente de tejido estromal. En una realización preferida, dichas MSC se derivan de tejido adiposo, y en una realización adicional preferida, de una fracción estromal de tejido adiposo. En una realización alternativa, dichas MSC se obtienen de condrocitos del cartílago hialino. En una realización adicional, dichas MSC se obtienen de la piel. En otra realización, dichas MSC se obtienen de la médula ósea. 55

Las MSC pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada de tejido conectivo de cualquier animal adecuado, lo más preferiblemente seres humanos. Se prefiere que dichas células se obtengan de fuentes de mamíferos no patológicas, preferiblemente fuentes posnatales (por ejemplo, roedores o primates). En una realización preferida, las MSC se obtienen de una fuente de tejido conectivo, tal como, pero sin limitarse a, la fracción estromal de tejido adiposo, cartílago hialino, médula ósea o piel. Lo más preferiblemente, las MSC de los métodos de la presente invención se obtienen de tejido adiposo estromal humano, posnatal, no patológico. 60 65

Los fibroblastos usados en el presente documento son tejido conectivo derivado de mesénquima que se asocia con la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular y se entenderá que incluye células sinoviales similares a fibroblastos. Los fibroblastos pueden obtenerse de cualquier animal adecuado, lo más preferiblemente ser humano.

- 5 Las células T reguladoras (alternativamente conocidas como células T supresoras), tal como se usa en el presente documento, pueden derivarse de cualquier fuente adecuada, tal como sangre o bazo. Las células T reguladoras pueden ser células CD4+Foxp3+ que se producen de manera natural, o pueden ser células T reguladoras aisladas y/o expandidas *ex-vivo*. Los métodos para la expansión *ex-vivo* de células T reguladoras se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de la sangre completa (por ejemplo, como parte de la fracción de PBMC) seguido por la expansión usando, por ejemplo, células madre mesenquimatosas o rapamicina.

15 Con respecto al receptor previsto de las composiciones farmacéuticas tal como se administran según la presente invención, las células MSC pueden ser de origen o bien alogénico (donante) o bien autólogo (sujeto). En una realización preferida del método, dichas células MSC son de origen alogénico.

20 Las MSC usadas en el método de la presente invención se caracterizan preferiblemente porque (i) no expresan marcadores específicos para células que presentan antígenos, (ii) no expresanIDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) de manera constitutiva, (iii) expresanIDO tras la estimulación con IFN-gamma, y en el caso de MSC (iv) presentan la capacidad de diferenciarse para dar al menos dos linajes celulares.

25 Las MSC son células madre multipotentes y tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse para dar al menos dos, más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más linajes celulares. Los ejemplos ilustrativos no limitativos de linajes celulares en los que dichas MSC pueden diferenciarse incluyen osteocitos, adipocitos, condrocitos, tenocitos, miocitos, cardiomiocitos, células estromales de soporte hematopoyético, células endoteliales, neuronas, astrocitos y hepatocitos. Las MSC pueden proliferar e inducirse a diferenciarse para dar células de otros linajes mediante métodos convencionales. Los métodos de identificación y posteriormente aislamiento de células diferenciadas de sus homólogos no diferenciados también pueden llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

30 Preferiblemente, las MSC son células cultivadas *ex-vivo*, los métodos para la expansión de poblaciones de MSC se conocen en la técnica. El aislamiento posterior de las MSC puede mantenerse y permitirse que proliferen *ex vivo* en un medio de cultivo celular. Tal medio puede estar compuesto de, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con antibióticos (por ejemplo, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) o sin antibióticos, y glutamina 2 mM, y complementado con suero bovino fetal (FBS) al 2%-20%. Se encuentra dentro de la habilidad del experto en la técnica modificar o modular las concentraciones de los medios y/o los complementos de los medios según sea necesario para las células usadas. Los sueros a menudo contienen factores y componentes celulares y no celulares que son necesarios para la viabilidad y expansión. Los ejemplos de sueros incluyen suero bovino fetal (FBS), suero bovino (BS), suero de ternero (CS), suero de ternero fetal (FCS), suero de ternero recién nacido (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, suero de rata (RS), etc. También se encuentra dentro del alcance de la invención que si dichas MSC son de origen humano, el medio de cultivo celular se complementa con un suero humano, preferiblemente de origen autólogo. Se entenderá que los sueros pueden inactivarse mediante calor a 55-65°C si se considera necesario para inactivar los componentes de la cascada de complementos. La modulación de las concentraciones de suero y/o la retirada de suero del medio de cultivo también puede usarse para promover la supervivencia de uno o más tipos de células deseados. Preferiblemente, dichas MSC se beneficiarán de concentraciones de FBS de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 25%. En otra realización, las MSC pueden expandirse en un medio de cultivo celular de composición definida, en el que el suero se reemplaza por una combinación de albúmina sérica, transferrina sérica, selenio y proteínas recombinantes que incluyen, pero sin limitarse a, insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (FCFb) tal como se conoce en la técnica.

50 Muchos medios de cultivo celulares ya contienen aminoácidos, sin embargo algunos requieren complementación antes del cultivo de células. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, L-alanina, L-arginina, ácido L-aspartico, L-asparagina, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina, y similares.

55 Los agentes antimicrobianos también se usan normalmente en cultivos celulares para mitigar la contaminación bacteriana, micoplasmática y fúngica. Normalmente, los compuestos antibióticos o antimicóticos usados son mezclas de penicilina/estreptomycin, pero también puede incluir, pero no se limitan a, anfotericina (Fungizone(R)), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, etc.

60 Las hormonas también pueden usarse ventajosamente en cultivos celulares e incluyen, pero no se limitan a, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, b-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona del crecimiento humana (HGH), etc.

65 En una realización, las células madre mesenquimatosas pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas. Se prefiere particularmente que dichas células madre mesenquimatosas sean alogénicas al paciente o sujeto al que se administran o se pretende para la administración.

Células expandidas

En una realización, las células madre mesenquimatosas pueden haberse expandido antes de su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención.

5 En determinadas realizaciones, las células pueden cultivarse durante al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 25 días, o al menos aproximadamente 30 días. La expansión de células en cultivo puede mejorar la homogeneidad del fenotipo celular en la población celular, por consiguiente, en una realización preferida, dichas células se cultivan hasta que sean sustancialmente homogéneas.

10 En determinadas realizaciones, las células se expanden en cultivo durante al menos tres pases de cultivo o “se pasan al menos tres veces”. En otras realizaciones, 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. Se aprecia que el potencial de diferenciación multilínea de las células puede disminuir durante la expansión, por ejemplo, con sucesivos pases de las células; sin embargo, tales células de la progenie se encuentran dentro del alcance de las realizaciones de la presente invención. Los métodos para la expansión celular se conocen en la técnica y pueden comprender el uso de biorreactores en 2 dimensiones o en 3 dimensiones comercialmente disponibles.

20 Células crioconservadas

En una realización, las células madre mesenquimatosas pueden haberse crioconservado y descongelado antes de su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención.

25 Los métodos para la crioconservación de células madre se conocen en la técnica y pueden incluir el uso de tampones o medio de crioconservación. Tales tampones se conocen en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles.

Células diseñadas por ingeniería genética

30 En otra realización, las células MSC pueden ser células diseñadas por ingeniería genética (por ejemplo, transducidas o transfectadas con un ácido nucleico exógeno), o derivadas de las mismas.

35 Por ejemplo, dichas células pueden diseñarse por ingeniería genética para expresar de manera constitutiva indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), por ejemplo, mediante transfección con un constructo de ácido nucleico apropiado que codifica para dicha enzima y opcionalmente una secuencia promotora adecuada. El diseño por ingeniería genética de células se conoce en la técnica y puede llevarse a cabo por un experto en la técnica.

Células irradiadas

40 En aún otra realización, las células MSC pueden haberse irradiado antes de su uso en el método de la presente invención. La irradiación de células reduce sus capacidades proliferativas y tiempos de supervivencia.

45 La irradiación puede llevarse a cabo usando una fuente controlada adecuada de radiación ionizante, tal como un dispositivo de irradiación gamma. Las condiciones de irradiación deben ajustarse experimentalmente por un experto en la técnica para determinar el tiempo de exposición requerido para transmitir una dosis de radiación que provoque la detención del crecimiento a largo plazo de las MSC, las células T reguladoras y/o las células de fibroblastos. En una realización, dicha dosis de radiación se encuentra dentro de un intervalo seleccionado del grupo que consiste en 1-100 Gy, 5-85 Gy, 10-70 Gy, 12-60 Gy, sin embargo, se prefiere particularmente que dicha dosis de radiación se encuentre dentro del intervalo de 15-45 Gy, normalmente 20-30 Gy o 22-28 Gy.

Células tratadas con antagonistas de CD26

55 En todavía otra realización, las células MSC pueden tratarse con un antagonista o inhibidor de CD26 antes de su uso en el método de la presente invención. Los antagonistas e inhibidores de CD26 se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, aminometilpiridina; P32/98; NVP DPP728; PSN9301; isoleucina tiazolidida; denagliptina; sitagliptina; vildagliptina; saxagliptina; alogliptina; diprotina A, y tal tratamiento puede llevarse a cabo por un experto en la técnica.

60 Células estimuladas con IFN-gamma

65 En otra realización, las células MSC pueden estimularse con interferón gamma antes de su uso en el método de la presente invención. El tratamiento con IFN-gamma de MSC para la estimulación de las mismas se conoce en la técnica (por ejemplo, Krampera *et al.*, Stem Cells. febrero de 2006;24(2) :386-98) y puede llevarse a cabo por un experto en la técnica.

Células estimuladas con antígenos

5 En todavía otra realización, las células MSC pueden estimularse con antígenos antes de su uso en el método de la presente invención. El tratamiento con antígenos de MSC para la estimulación de las mismas se conoce en la técnica y puede llevarse a cabo por un experto en la técnica.

MSC tratadas con mitomicina C

10 En aún otra realización, las células MSC pueden tratarse con mitomicina C antes de su uso en el método de la presente invención. El tratamiento con mitomicina C de MSC se conoce en la técnica y puede llevarse a cabo por un experto en la técnica.

15 Además, si se desea, las células MSC pueden someterse a una combinación de dos o tres de los tratamientos seleccionados del grupo que consiste en irradiación, estimulación con IFN-gamma y tratamiento con mitomicina C antes de su uso en el método de la presente invención.

20 Las condiciones de mantenimiento de dichas MSC también pueden contener factores celulares que permitan a las células permanecer en una forma no diferenciada. Resulta evidente para los expertos en la técnica que antes de la diferenciación, los complementos que inhiben la diferenciación celular deben retirarse del medio de cultivo. También resulta evidente que no todas las células requerirán estos factores. De hecho, estos factores pueden provocar efectos no deseados, dependiendo del tipo de célula.

25 Se ilustrarán diversas realizaciones de la invención mediante los siguientes ejemplos que ilustran, pero no limitan, la invención descrita en el presente documento.

**Ejemplo 1**

Evaluación de biomarcadores de linfocitos en pacientes que responden y pacientes que no responden a la terapia con MSC.

30 Las terapias con células madre tienen un potencial significativo para su uso en el tratamiento de trastornos caracterizados por daño e inflamación tisular. Para identificar marcadores basados en sangre que tienen utilidad en la determinación del pronóstico del paciente para tales terapias, la fístula anal en pacientes con enfermedad de Crohn es trastorno modelo ideal ya que se caracteriza por daño tisular en un paciente que tiene una enfermedad inflamatoria. El análisis de linfocitos en muestras de sangre de pacientes se llevó a cabo tanto antes como después del tratamiento con células derivadas de tejido adiposo expandidas alogénicas (eASC).

Materiales y métodos

40 Población de pacientes

45 La población de pacientes consistió en 24 pacientes con enfermedad de Crohn que tenían una fístula perianal compleja tratada en un ensayo clínico multicéntrico de fase I/II (clinicaltrials.gov, identificador NCT01372969). Se trataron los pacientes con una administración intralesional de 20 millones de eASC. Se determinó la curación de la fístula 12 semanas después del tratamiento, y en el caso de una curación incompleta, se administró una segunda dosis de 40 millones de eASC. Se recogió la sangre completa de los pacientes en dos puntos de tiempo durante el ensayo, en el nivel inicial y a los 15 días.

50 Se realizó una RMN en el nivel inicial para evaluar colecciones >2 cm asociadas con el trayecto de la fístula. Se monitorizaron los sujetos durante 24 semanas en total y se evaluó la curación en las semanas 12 y 24 por medio de evaluación radiológica y clínica.

55 Se usó el cierre de la fístula a las 12 semanas para definir a los pacientes como que responden (n=9), todos los demás pacientes se definieron como que no responden (n=15). Se definió el cierre de la fístula como la ausencia de supuración de la fístula a través del orificio externo, tanto de manera espontánea como al aplicar presión, con reepitelización completa del orificio externo durante la evaluación clínica y la ausencia de colecciones >2 cm, en tres ejes, directamente relacionadas con el trayecto de la fístula tratada, tal como se mide mediante RMN. Se evaluaron las fístulas en dos visitas consecutivas, es decir, semanas 10; 12 y 22; 24 para evitar malas interpretaciones y guiar las decisiones del tratamiento. Se llevó a cabo la evaluación de la fístula tanto por el médico tratante como por un médico independiente. La tabla 1 proporciona una visión general del estado de la respuesta de cada sujeto individual y el análisis llevado a cabo sobre sus muestras de sangre.

Aislamiento de PBMC

65 Se recogieron las muestras de sangre de los pacientes en el nivel inicial y a los 15 días. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de las muestras de sangre usando Ficoll-paque Plus (GE Healthcare

Biosciences AB, Uppsala, Suecia) siguiendo el protocolo del proveedor. Brevemente, se diluyeron las muestras de sangre con solución salina equilibrada y se añadió Ficoll para crear un gradiente de densidad. Después de la centrifugación, se recogió la interfase que contenía las células mononucleares. Se verificó la pureza mediante citometría de flujo.

5

#### Células madre mesenquimatosas

La especialidad farmacéutica de eASC alogénicas consistió en una suspensión celular de células madre adultas vivas de origen mesenquimatoso extraídas de tejido adiposo subdérmico de donantes sanos. Se sometió a liposucción el tejido adiposo subdérmico de los donantes sanos y se transportó a la instalación de fabricación. Se llevaron a cabo la donación, la adquisición y las pruebas según los requisitos de la Directiva 2004/23/EC, y por tanto bajo las Directivas 2006/17/EC y 2006/83/EC. Se aislaron las ASC digiriendo el tejido adiposo con colagenasa al 0,075% (tipo I, Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido por centrifugación. Se resuspendieron los sedimentos celulares obtenidos y se lisaron en disolución de lisis de eritrocitos (suero bovino fetal (FBS) al 10%, tratado con NH<sub>4</sub>Cl 160 mM) y se centrifugó. Se resuspendió la fracción vascular estromal, resultante de los sedimentos celulares, en medio de cultivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco; DMEM) con FBS al 10%) y se colocó en recipientes de cultivo celular en medio de cultivo y antibióticos, y se incubó a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub> y en una atmósfera humidificada. A las 24-48 h después de la siembra en placa, se retiró el medio de cultivo para eliminar la fracción celular no unida. Se expandieron las ASC adheridas a las placas de cultivo de plástico en condiciones *in vitro*. Cada 3-4 días, se cambió el medio de cultivo después de alcanzar una confluencia del 90-95% y se separaron las células con tripsina/EDTA, se recogieron, se centrifugaron y se expandieron sin antibióticos hasta la duplicación requerida. Luego se cosecharon y crioconservaron hasta su uso. Antes de la fecha de administración designada, se descongelaron los suficientes viales crioconservados para proporcionar la dosis requerida para la administración. Se recuperaron las ASC de su estado crioconservado sembrándolas en placa y cultivándolas (para confirmar la viabilidad). En el día en el que se llenaron y se envasaron los viales, se lavaron los cultivos con disolución de tampón fosfato y tripsina/EDTA. Se resuspendieron inmediatamente las eASC en los excipientes seleccionados (medio de Eagle modificado por Dulbecco y suero de albúmina humano) para formular el medicamento.

10

15

20

25

#### Citometría de flujo

30

35

Se usaron anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, CD25, FOXP3, HLA-II, (BD Bioscience) marcados con diferentes fluorocromos. Los controles de isotipo eran de BD Bioscience. Se cosecharon las células y se tiñeron con los anticuerpos monoclonales de superficie apropiados siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del lavado, se fijaron las células y se adquirieron 10x10<sup>3</sup> eventos usando un FACSCanto (BD Bioscience). Se usó el software FACS Diva para la adquisición y el análisis.

#### Inmunofenotipado de células T circulantes

40

Se estudió el repertorio celular de sangre periférica de los pacientes en el nivel inicial y a los 15 días. Se seleccionó la fracción mononuclear de sangre periférica para el análisis fenotípico de las células T (definidas por CD3+), linfocitos T auxiliares (definidos por CD3+CD4+) y células T citotóxicas (definidas por CD3+CD8+).

#### Expresión de linfocitos HLA-II

45

50

Se determinaron los niveles de expresión de HLA II tras el cocultivo *in vitro* de las muestras de PBMC de pacientes con las eASC alogénicas de la especialidad farmacéutica como un indicador de reconocimiento inmunitario *in-vivo* de las eASC del donante. Brevemente, se sembraron las eASC en una placa de 96 pocillos (3 x 10<sup>3</sup>) y se cultivaron durante 24 horas, solas o en presencia de PBMC (2 x 10<sup>5</sup>) de cada uno de los pacientes en el ensayo. Después del cultivo, se recolectaron las células y se realizó el análisis mediante FACS. Se usaron anticuerpos monoclonales contra CD3 y HLA II para medir la expresión de HLA II en células T después de la incubación *in-vitro* con o sin ASC (control).

#### Estadística

55

Se usó la prueba de la t de Student para datos emparejados para analizar la diferencia estadística. Los valores p de menos de 0,05 se consideraron como significativos.

#### Resultados

60

#### Inmunofenotipo de células T

65

Se analizó el repertorio de células circulantes de los participantes del estudio mediante citometría de flujo. Se estudió el porcentaje de la distribución de células T (población de CD3+ en la región de linfocitos), linfocitos T auxiliares, células T citotóxicas y células T reguladoras en PBMC aisladas en los grupos de pacientes que responden y que no responden en las muestras recogidas antes de tratarse con eASC.

Se observaron variaciones en el compartimento de células T entre los grupos que responden y que no responden. Tal como se muestra en la figura 1, el grupo que responde presentó niveles inferiores de células T CD4 (el 45,2±5% de la población celular de CD3+) y niveles más altos de células T CD8 (el 54,8±5% de la población celular de CD3+) que la población que no responde. El grupo que no responde presentó una distribución relativamente normal de células T CD4 y CD8 (el 34,99±7% de CD8 y el 65,01±7% de CD4 de la población celular de CD3+ total). Por consiguiente, los valores de corte en el intervalo del 45% al 65%, más preferiblemente del 50%-60% de linfocitos CD8+ y del 35% al 55%, más preferiblemente del 40% al 50% de linfocitos CD4+ son adecuados para discriminar entre las poblaciones que responden y las que no responden.

10 Como un medio alternativo de expresión de estos valores, se calculó la razón CD4:CD8 y se proporciona en la figura 2. Estos datos mostraron que la población que no responde tenía una razón CD4:CD8 media superior a 1,5, sin embargo la población que responde, debido al aumento del compartimento celular citotóxico y a la disminución de la población auxiliar, tiene una razón media por debajo de 1,5, lo que indica que este grupo de pacientes tuvo un perfil inmunitario más activado.

15 Expresión de linfocitos HLA-II

20 Se estudiaron los niveles de expresión de HLA II tras el cocultivo *in vitro* de las muestras de PBMC de voluntarios (tanto antes como después del tratamiento con eASC) con las eASC alogénicas del donante. HLA II es una indicación del reconocimiento inmunitario *in-vivo* de las eASC del donante. El porcentaje de expresión del marcador de HLA-II se proporciona en la figura 3. Se demostró que los pacientes en el grupo que responde tenían una expresión de HLA-II regulada por disminución significativa. en el nivel inicial en el grupo que no responde, la expresión de HLA-II media fue de 22,93 con una desviación estándar de +/-9,5 en PBMC y una media de 23,77 con una desviación estándar de +/-9,91 para PBMC + ASC cocultivadas. En el grupo que responde, la expresión de HLA-II media fue de 24,35+/-12,51 en PBMC, que disminuyó sorprendentemente hasta 17,73 con una desviación estándar de +/-9,71 en PBMC+ASC cocultivadas.

30 Además, esta regulación por disminución también se observó en el día 15, lo que indica que el marcador de HLA-II puede usarse en la determinación de la respuesta clínica tanto antes de, como durante las etapas tempranas del tratamiento.

Tabla 1

Paciente	Respuesta al tratamiento	Ensayo de CD4	Ensayo de CD8	Ensayo de HLA-II
1	Pacientes que no responden	✓	✓	✓
2		✓	✓	✓
3		X	x	✓
4		✓	✓	✓
5		✓	✓	✓
6		X	x	✓
7		✓	✓	✓
8		✓	✓	✓
9		✓	✓	✓
10		X	x	✓
11		✓	✓	✓
12		✓	✓	✓
13		✓	✓	✓
14		✓	✓	✓
15		✓	✓	✓
16	Pacientes que responden	X	x	✓
17		✓	✓	✓
18		✓	✓	✓
19		✓	✓	✓

ES 2 748 825 T3

20		✓	✓	✓
21		X	x	✓
22		✓	✓	✓
23		✓	✓	✓
24		✓	✓	✓

**REIVINDICACIONES**

1. Método para predecir la respuesta clínica a la administración de una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas en un paciente que padece una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario evaluando uno o más marcadores de linfocitos en el que dicho marcador de linfocitos es el nivel de linfocitos CD4+ y/o CD8+, en el que el paciente se clasifica como que responde si:
- (a) el paciente tiene un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55% de los linfocitos T totales;
- (b) el paciente tiene un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65% de los linfocitos T totales; o si
- (c) el paciente tiene una razón celular CD4+:CD8+ igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5.
2. Composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento de un paciente humano que tiene una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario, en la que el paciente se selecciona para que responda a las células madre mesenquimatosas mediante el método según la reivindicación 1.
3. Método según la reivindicación 1 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en el que las células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que las células madre mesenquimatosas son células madre alogénicas.
5. Composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene un nivel de CD4+ igual a un valor en el intervalo del 35% al 55% de linfocitos T determinado mediante el método según la reivindicación 1.
6. Composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene un nivel de CD8+ igual a un valor en el intervalo del 45% al 65% de linfocitos T determinado mediante el método según la reivindicación 1.
7. Composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria o mediada por el sistema inmunitario en un paciente humano que tiene una razón celular CD4+:CD8+ igual a un valor en el intervalo de 1,2 a 0,5 determinado mediante el método según la reivindicación 1.

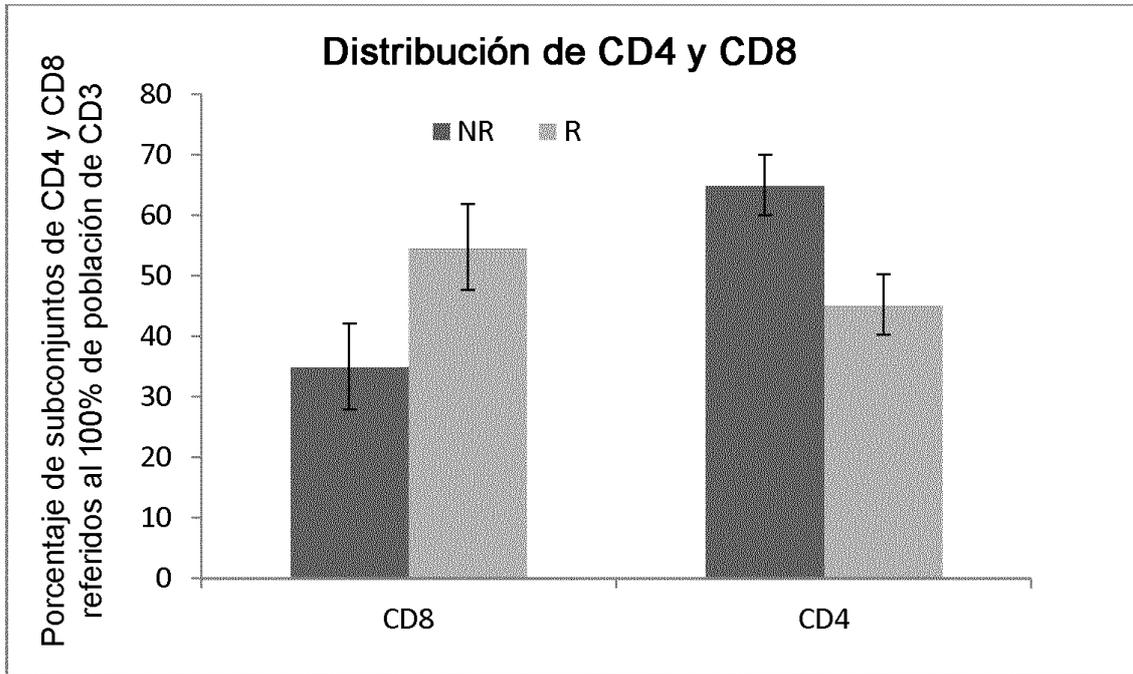


Fig. 1

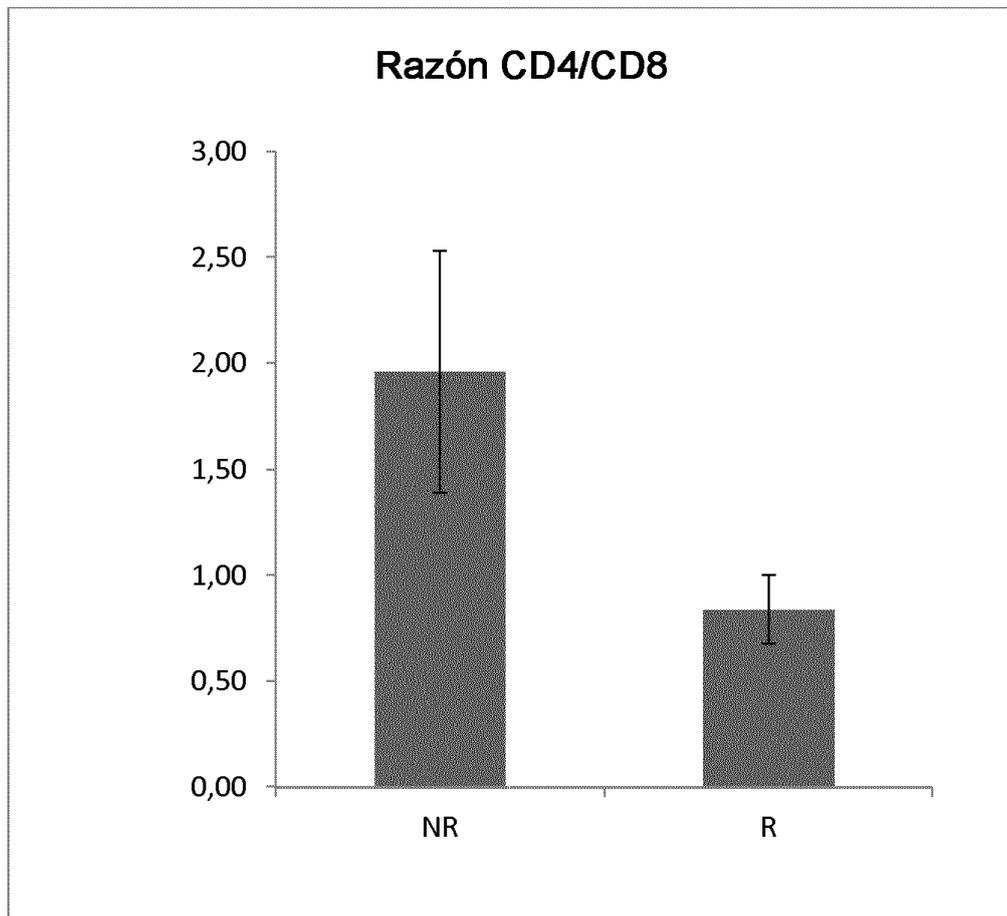


Fig. 2

e

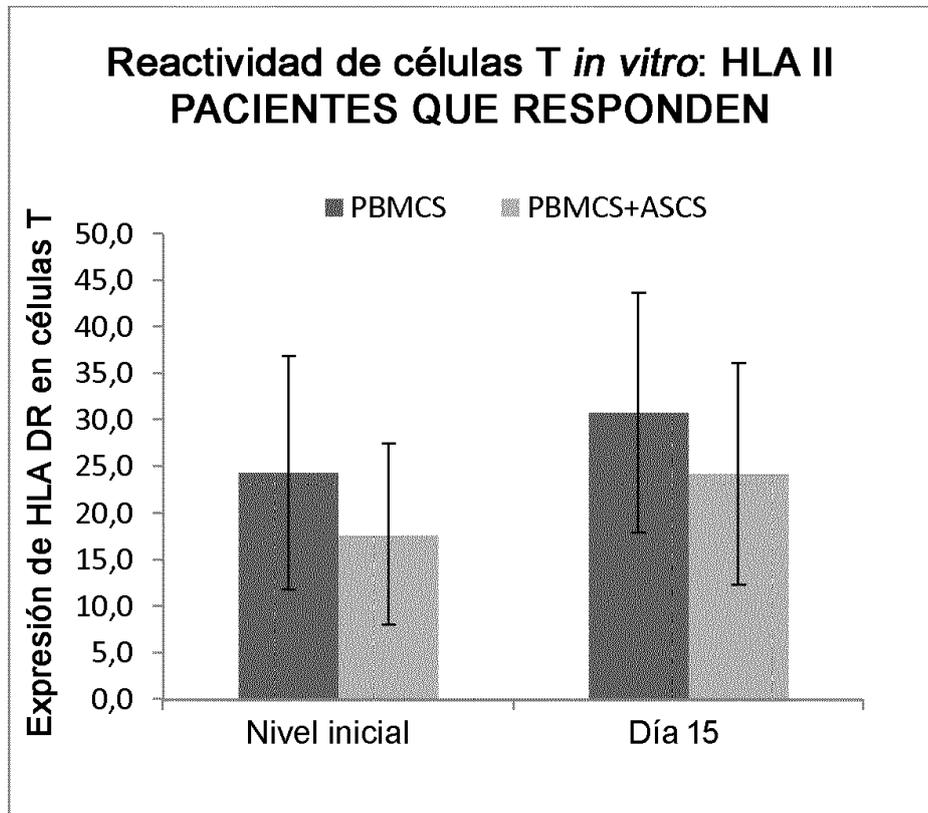
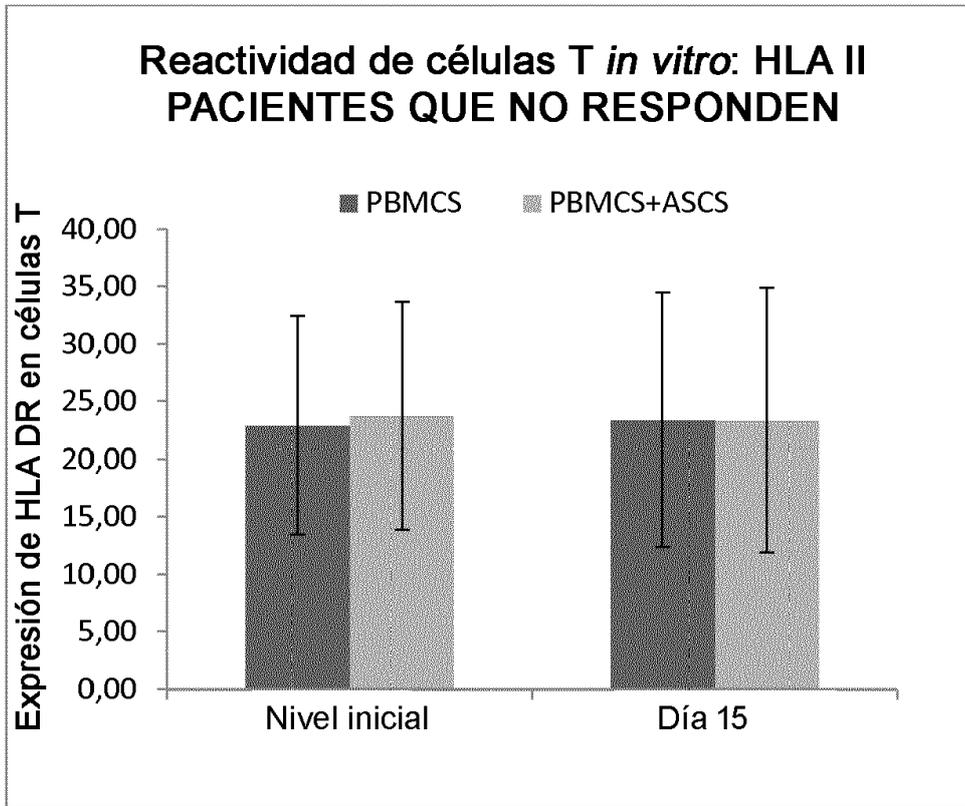


Fig. 3