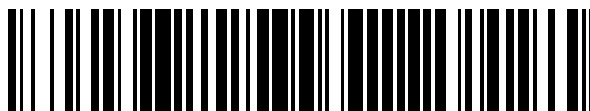


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 977**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2013** **E 17182589 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 3254697**

54 Título: **Medios para tratar regeneración tardía de fracturas**

30 Prioridad:

**03.02.2012 EP 12153850**

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

**18.05.2020**

73 Titular/es:

**CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
(100.0%)  
Charitéplatz 1  
10117 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**DUDA, GEORG, PROF. DR.;  
VOLK, HANS-DIETER, PROF. DR.;  
REINKE, SIMON, DR. RER. MEDIC.;  
SCHMIDT-BLEEK, KATHARINA, DR.;  
MEISEL, CHRISTIAN;  
KLEBER, CHRISTIAN y  
GEISSLER, SVEN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 760 977 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

Medios para tratar regeneración tardía de fracturas

La presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento y prevención de la regeneración tardía de fracturas óseas.

La regeneración de fracturas es un proceso fisiológico con etapas secuenciales superpuestas y da como resultado una restauración del tejido óseo. Sin embargo, bajo ciertos factores de riesgo, como fracturas severas, edad avanzada, terapia con esteroides o diabetes, este proceso puede retrasarse o incluso ser incompleto (regeneración sin unión) con un pobre resultado a largo plazo y un alto impacto socioeconómico. La regeneración tardía o incompleta se puede observar en aproximadamente el 5-10 % de los pacientes después de una fractura de los huesos largos.

Solo se dispone de un conocimiento limitado acerca de los mecanismos detrás de la pobre regeneración. Cada vez hay más pruebas que sugieren un papel clave de la inflamación y la respuesta de las células T dentro de los procesos de reparación ósea después de una lesión, en el que la respuesta de las células T afecta procesos tales como la quimiotaxis, reclutamiento de más células inmunes y mesenquimatosas que resultan en una angiogénesis estimulante, y finalmente, mejora de la síntesis de matriz extracelular (Schmidt-Bleek et al., J Orthop Res.; 27(9):1147-51; Kolar et al., Tissue Eng Part B Rev.; 16(4):427-34; Toben et al. J Bone Miner Res., Jan;26(1):113-24).

Datos recientes muestran que los ratones deficientes en inmunidad adaptativa expresaron sorprendentemente la regeneración ósea mejorada, aunque la mineralización fue menos efectiva que en los controles (Colburn et al. Arthritis Rheum.; 60(6):1694-703; Schmidt-Bleek et al. Cell Tissue Res; DOI 10.1007/s00441-011-1205-7). Además, se encontró un porcentaje significativamente mayor de células T citotóxicas dentro del hematoma en ovejas con regeneración tardía/deteriorada, debido a un tratamiento con un fijador externo mecánicamente crítico que tiene una alta inestabilidad rotacional, en comparación con los animales rígidamente fijados.

Existe una necesidad insatisfecha de biomarcadores que predican el resultado después de la fractura ósea para administrar terapias de apoyo lo antes posible, como factores de crecimiento como BMP (proteína morfogenética ósea), que son de alto coste y no están libres de efectos adversos.

El objeto de la divulgación es proporcionar medios y procedimientos para el tratamiento de la fractura ósea tardía.

La presente invención se realizó durante el curso de una investigación que evalúa la reacción inflamatoria y la composición de las células inmunes en sangre periférica de pacientes con fractura tibial proximal durante el proceso de regeneración en puntos de tiempo típicos de relevancia clínica. Se identificaron diferencias relevantes en la composición de las células inmunes en la sangre periférica durante el proceso de regeneración de fracturas relacionadas con una regeneración tardía.

El recuento total de células T (CD3+) o la distribución principal del subconjunto (CD3+4+ y CD3+8+) no mostró diferencias entre los grupos (regeneración normal frente a tardía). Sin embargo, se descubrió sorprendentemente que la regeneración tardía estaba fuertemente asociada con una frecuencia significativamente mejorada de células T efectoras CD8+ diferenciadas terminalmente que expresan el fenotipo CD8+11 a ++28- y/o CD8+11 a++57+ y/o CD8+11a++CD28-57+, que corresponde a las células CD8+ TEMRA (CD57+8+ regeneración tardía frente a normal: 1,6-1,8 veces, CD28-8+ regeneración tardía frente a normal: 1,5-1,6 veces; CD11++8+ regeneración tardía frente a normal: 1,2-1,3 veces) en diferentes puntos de tiempo después de la lesión/operación (<1 semana a >18 semanas). Las células CD8+ TEMRA también expresan el fenotipo marcador CCR7-CD45RA+CD45RO-. Esta diferencia fue estable durante el tiempo de seguimiento de 18 semanas que refleja más bien la experiencia inmune individual en lugar de la reacción postraumática a la fractura.

Las células CD8+ TEMRA se caracterizan por sus propiedades de retorno tisular (inflamatorias) y su fuerte capacidad de respuesta presencial. También pueden activarse independientemente de su receptor de células T (TCR) en una materia independiente del antígeno por las citoquinas, como IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23 o TNFα. Esas citoquinas son administradas por células del sistema inmunitario innato activadas en el hematoma de fractura como resultado de la interacción entre las moléculas receptoras de tipo toll (TLR) y los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Además, los macrófagos y las células dendríticas pueden activar la liberación de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, IFN-gamma) por estas células CD8+TEMRA, que soportan inflamación y fibrosis arrolladoras, así como la inhibición de la osteogénesis. Además, estas células están sobreexpresadas en estados de activación inmunitaria crónica, como en enfermedades infecciosas, como VIH, tuberculosis o citomegalovirus.

Otro hallazgo sorprendente fue que la frecuencia de otro pequeño subconjunto de células T CD3+ en la sangre periférica, las llamadas células T CD4+8+ doble positivas, también aumenta en pacientes con regeneración tardía.

La frecuencia se refiere al número de células definidas por ciertas moléculas marcadoras presentadas en la superficie de estas células en relación con el número de células de una población definible completa. Por ejemplo,

una frecuencia del 5 % para la subpoblación CD8+CD4+ de las células CD3+ significa que el 5 % de todas las células CD3+ pertenecen a la subpoblación CD8+CD4+.

En algunos casos, las células pueden caracterizarse en la presente memoria mostrando el grupo de diferenciación positividad/negatividad en forma abreviada: CD4+8+ es sinónimo de CD4+CD8+. En general, para los procedimientos divulgados en la presente memoria, la frecuencia de una subpoblación dada se determina en relación con el número total de la población original (como se indica en cada tabla de células CD3+ o CD8+, respectivamente) en la muestra.

Si alguna población celular se designa como "positiva" con respecto a una determinada molécula marcadora en la presente memoria, esta designación significará que dicha población celular puede ser teñida por un anticuerpo marcado con pigmento fluorescente común contra la molécula marcadora y dará una señal de fluorescencia al menos una, dos o tres escalas logarítmicas más intensa en comparación con las células no marcadas o las células marcadas con el mismo anticuerpo pero comúnmente conocidas como que no expresan dicha molécula marcadora o un anticuerpo de control de isotipo. Viceversa, cualquier población celular que se designe como "negativa" con respecto a cierta molécula marcadora no puede ser teñida por un anticuerpo marcado con pigmento fluorescente como se describió anteriormente contra la molécula marcadora. Las células designadas como "doble positivo" o "++" con respecto a una determinada molécula marcadora significa que las células que exhiben una alta expresión de esta determinada molécula marcadora que se pueden separar como una subpoblación distinta mediante habilitación electrónica. Las células "++" dan una señal de fluorescencia significativamente más fuerte que la dada por las células en el extremo inferior del único portal positivo "+". Los eventos "++" generalmente se pueden distinguir como un grupo distinto. Las células "++" doble positivas para un marcador dado son parte de la población positiva "+" para ese marcador. La figura 12 muestra un histograma de células positivas y dobles positivas CD8/CD11: de todas las células positivas CD11a encerradas en los dos histogramas de ejemplo, las de la derecha de la barra vertical constituyen la población "++".

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de IFN-gamma (Uniprot P01579) o TNF- $\alpha$  (Uniprot P01375) para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor es un ligando para IFN-gamma o TNF- $\alpha$  seleccionado del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula similar a un anticuerpo, un constructo de receptor soluble, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos y una molécula de aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos en longitud, un inhibidor de la secreción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  (por ejemplo, ARN-si o moléculas pequeñas, como, por ejemplo, inhibidores de calcineurina) y en el que el ligando (el inhibidor) es capaz de enlazarse selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor, y en el que el ligando a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  (el inhibidor) es además capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra IFN-gamma o TNF- $\alpha$ . En una realización, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano contra IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, en el que el inhibidor es un fragmento de anticuerpo, el inhibidor es el dominio Fab de un anticuerpo (la región de enlace al antígeno de un anticuerpo) generado contra IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , o un anticuerpo de cadena única (scFv), es decir, una proteína de fusión que consiste en las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo conectado por un conector peptídico. Se puede fabricar un fragmento de anticuerpo o una molécula tipo anticuerpo mediante procedimientos adecuados tales como la expresión de proteína recombinante.

En una realización, el inhibidor es un constructo quimérico que une un dominio de enlace a antígeno que se enlaza selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , al dominio Fc de una inmunoglobulina humana. Un ejemplo de tal constructo es el fármaco etanercept (CAS No. 185243-69-0).

Un inhibidor de acuerdo con este aspecto de la invención también puede desarrollarse mediante procedimientos evolutivos tales como despliegue de fago, despliegue de ribosoma o SELEX, en los que los polipéptidos u oligonucleótidos se seleccionan de acuerdo con su afinidad de enlace a IFN-gamma o TNF- $\alpha$ . En algunas realizaciones, el oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos mencionado anteriormente es un péptido derivado de la parte de un asociado de enlace fisiológica de IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , que se reconoce selectivamente por IFN-gamma o TNF- $\alpha$ . En algunas realizaciones, la síntesis de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  puede bloquearse por ARN-si o fármacos de molécula pequeña, tales como inhibidores de calcineurina, inhibidores de fosfodiesterasa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de células CD8+ para su uso en un procedimiento para el tratamiento o terapia de regeneración tardía de fractura. En una alternativa, dicho inhibidor de las células CD8+ es un ligando para CD8, seleccionado del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula tipo anticuerpo, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos y una molécula de aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud, y en el que el ligando (el inhibidor) es capaz de enlazarse selectivamente a CD8 con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor, y en el que el ligando a CD8 (el inhibidor) es además capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de una célula T CD8+, particularmente capaz de inhibir la secreción de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  por dicha célula T CD8+.

En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra CD8. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano contra CD8, que incluye globulina antitimocítica.

5 En una realización de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo producido contra CD11a/CD18 (LFA-1). En una realización de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo producido contra CD49d (VLA-4). En una realización de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo producido contra CD137 (4-1BB).

10 En una realización de este aspecto de la invención, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra moléculas en CD8 activado tal como, a modo de ejemplo no limitante, CD11 a/CD18 (LFA-1), CD49d (VLA-4) o CD137 (4-1BB). En una realización, el inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano. En una realización de este aspecto de la invención, el inhibidor es un constructo quimérico que une un dominio de enlace a antígeno que se enlaza selectivamente a CD8 o un antígeno de activación específico de CD8, tal como CD11a/CD18 (LFA-1), CD49d (VLA-4), CD137 (4-1 BB), al dominio Fc de una inmunoglobulina humana. Un ejemplo de tal constructo es el fármaco alefacept (número CAS 222535-22-0).

15 De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la regeneración tardía de fracturas, que comprende un inhibidor de (o ligando a) IFN-gamma o TNF- $\alpha$  o CD8 de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores de la invención.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración parenteral, tal como administración subcutánea, intravenosa, intrahepática, intramuscular o administración local intrafractura.

20 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de ingrediente activo. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 % de ingrediente activo (líoofilizado).

25 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un inhibidor de IFN-gamma y un inhibidor de TNF- $\alpha$ . En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un inhibidor de CD8. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal u otros agentes neutralizantes contra IFN-gamma y un anticuerpo monoclonal o agente neutralizante (por ejemplo, un constructo Fc-Ig dirigido contra TNF- $\alpha$ , tal como etanercept) contra TNF- $\alpha$ .

30 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una forma de dosificación para tratar la regeneración tardía de fractura, que comprende un inhibidor de (o ligando a) IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores de la invención.

Las formas de dosificación pueden ser para administración enteral, como administración nasal, bucal, rectal, transdérmica u oral, o como una forma de inhalación o supositorio. Alternativamente, se puede usar la administración parenteral, tal como formas de inyección subcutánea, intravenosa, intrahepática o intramuscular. Opcionalmente, puede estar presente un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 También se divulga un procedimiento para tratar a un paciente que sufre una regeneración tardía de fractura, que comprende la administración a dicho paciente, de un inhibidor de (o ligando a) IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , o una composición farmacéutica o forma de dosificación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores de la invención. De manera similar, se contempla un procedimiento para tratar a un paciente que sufre una regeneración tardía de fracturas, que comprende la administración a dicho paciente, de un agente capaz de afectar el agotamiento de células T CD8+ en dicho paciente, tal como un anticuerpo a CD8.

40 Por lo tanto, los objetos relacionados con la aplicación terapéutica de la invención divulgada en la presente memoria son:

1. Un inhibidor de IFN-gamma (Uniprot P01579) o TNF- $\alpha$  (Uniprot P01375) para su uso en un procedimiento para el tratamiento o terapia de regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor
  - 45 a. es un ligando a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  capaz de enlazarse selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor, y en el que el inhibidor
  - b. es capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .
2. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con el objeto 1, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula tipo anticuerpo, un constructo de
  - 50 receptor soluble, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos derivados de un receptor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  y una molécula aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud.
3. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con el objeto 1 o 2, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .
4. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con cualquiera de los objetos anteriores, en el que dicho
  - 55 inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico (parcialmente humano), humanizado o humano.

5. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con cualquiera de los objetos anteriores, en el que dicho inhibidor es un constructo quimérico que une un dominio de enlace a antígeno que se enlaza selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , a un dominio Fc de una inmunoglobulina humana.

6. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con el objeto 5, en el que el inhibidor es etanercept (número CAS 185243-69-0).

7. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor es una molécula inhibitoria de ARN o ADN direccionada a ARNm que codifica IFN-gamma o TNF- $\alpha$  (ARN-si, ARN-mi, ARN-sh, ADN antisentido).

8. Un inhibidor de las células CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas, en el que dicho inhibidor es capaz de enlazarse selectivamente a la superficie celular de una célula T CD8+ activada, y en el que dicho inhibidor además es capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de una célula T CD8+ activada, particularmente capaz de inhibir la secreción de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  por dicha célula T CD8+.

9. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas de acuerdo con el objeto 8, en el que dicho inhibidor es un ligando a un miembro comprendido en el grupo marcador CD8 que comprende CD8, CD11 a/CD18 (LFA-1), CD49d (VLA-4), CD137 (4-1BB), y dicho inhibidor es capaz de enlazarse selectivamente a dicho miembro de dicho grupo marcador con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor.

10. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas de acuerdo con el objeto 8 o 9, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula tipo anticuerpo, un constructo de receptor soluble, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos derivados de un receptor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  y una molécula aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud.

11. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas de acuerdo con uno cualquiera de los objetos 8 a 10, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra CD8, CD11a/CD18 (LFA-1), CD49d (VLA-4) o CD137 (4-1BB).

12. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas de acuerdo con uno cualquiera de los objetos 8 a 10, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico (parcialmente humano), humanizado o humano.

13. El inhibidor de las células activadas CD8+ de acuerdo con el objeto 12, en el que dicho inhibidor es alefacept (número CAS 222535-22-0).

14. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor es una molécula inhibitoria de ARN o ADN direccionada al ARNm que codifica CD8, CD11 a/CD18 (LFA-1), CD49d (VLA-4) o CD137 (4-1BB) (ARN-si, ARN-mi, ARN-sh, ADN antisentido).

15. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, que comprende un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , o un inhibidor de células T CD8 activadas, de acuerdo con uno cualquiera de los objetos anteriores.

16. La composición farmacéutica de acuerdo con el objeto 15, en la que dicha composición comprende un inhibidor de IFN-gamma y un inhibidor de TNF- $\alpha$ .

17. La composición farmacéutica de acuerdo con el objeto 15, en la que dicha composición comprende un inhibidor de las células T CD8 activadas de acuerdo con uno cualquiera de los objetos 8 a 14.

Dondequiera que se presenten alternativas para características separables individuales tales como, por ejemplo, una molécula marcadora o un inhibidor en la presente memoria como "realizaciones", debe entenderse que tales alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones discretas de la invención divulgadas en la presente memoria.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales pueden obtenerse realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos están destinados a ilustrar la invención pero no a limitar su alcance.

### Descripción de las figuras

Figura 1 muestra el puntaje de Calori de pacientes con regeneración normal y tardía (mediana, cuartiles inferior y superior).

Figura 2 muestra la fuerza máxima de reacción en el suelo (A) y la velocidad media de caminata (B) de los pacientes con regeneración normal y tardía después de 6, 12 y 18 semanas post operación (mediana, cuartil inferior y superior).

Figura 3 muestra la frecuencia de las células CD8+CD4+ en las poblaciones de células T CD3+ de pacientes con regeneración normal y tardía (mediana de la gráfica superior, cuartiles inferior y superior, valores de la media de la gráfica inferior).

Figura 4 muestra la frecuencia de las células CD11a++ en la población de células T CD8+ de pacientes con regeneración normal y tardía, así como en un grupo de control sano sin fracturas (mediana, cuartiles inferior y superior).

Figura 5 muestra la frecuencia de las células CD57+ en la población de células T CD8+ de pacientes con regeneración normal y tardía, así como un grupo de control sano sin fracturas (mediana, cuartiles inferior y superior).

Figura 6 muestra la frecuencia de las células CD28- en la población de células T CD8+ de pacientes con regeneración normal y tardía, así como un grupo de control sano sin fracturas (mediana, cuartiles inferior y superior).

- 5 Figura 7 muestra la expresión de citoquinas (A IL6; B IL-8) en muestras de sangre de pacientes con regeneración normal y tardía (mediana, cuartiles inferior y superior).

Figura 8 muestra la migración CD8+ TEMRA al hematoma de fractura (proporción).

- 10 Figura 9 muestra la fracción de células productoras de IFN- $\gamma$  de células CD4+, células CD8+ y células CD8+CD57+CD28- en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células del estroma mesenquimatoso de médula ósea humana (BM-MSC) (valor de la media).

Figura 10 muestra la inhibición de la osteogénesis de las células estromales mesenquimales de la médula ósea por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Figura 11 muestra el agotamiento de CD8+ y la mejora de la regeneración de fracturas óseas en un modelo de ratón.

- 15 Figura 12 muestra un ejemplo para la determinación de células CD11a++.

Figura 13 muestra la frecuencia de las células CD57+ en la población de células T CD8+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).

Figura 14 muestra la frecuencia de las células CD28- en la población de células T CD8+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).

- 20 Figura 15 muestra la frecuencia de células CD57+ (panel superior) y células CD28- (panel inferior) en la población de células T CD4+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).

## **Materiales y procedimientos**

### Sujetos y protocolo de estudio

- 25 Entre julio de 2008 y agosto de 2010, 15 pacientes fueron incluidos en este estudio con una fractura de tibia proximal aislada y cerrada (de 23 a 64 años, 9 hombres y 8 mujeres).

- 30 Debido a la evaluación de la función biomecánica y los parámetros inmunológicos, los pacientes con enfermedades crónicas (por ejemplo, osteoporosis, diabetes, artritis reumatoide, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia renal), especialmente una infección por el virus de inmunodeficiencia humana o infección por hepatitis, fueron excluidos del estudio. Además, los pacientes con varias fracturas o con la presencia de la articulación de la cadera, la articulación del hombro o la articulación del tobillo también fueron excluidos del estudio.

El estudio se realizó de conformidad con la Conferencia Internacional sobre Pautas de Armonización de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Charité - Universitätsmedizin Berlin (Nr. EA1/006/08).

- 35 Protocolo y plan de evaluación

- 40 Para evaluar las primeras etapas de la regeneración de la fractura y en armonización con los puntos de examen clínico establecidos durante la regeneración de la fractura, se investigó a los pacientes tres o cinco días post operación (en lo sucesivo llamado, "primera semana"), después de dos semanas, cuatro semanas, seis semanas, doce semanas y dieciocho semanas. En cada punto de prueba, todos los pacientes se sometieron a los siguientes procedimientos.

### Muestras de sangre

- 45 En cada día de prueba, se tomaron muestras de sangre por la mañana entre las 9:00 a.m. y las 12:00 a.m., después de 15 minutos de descanso en posición supina. Todas las muestras de sangre se trasladaron inmediatamente a una habitación oscura con aire acondicionado y se enviaron al laboratorio en dos horas. Además, se recolectaron muestras de plasma y suero en alícuotas y se congelaron a -80 °C.

- 50 Se midieron el conteo sanguíneo completo y las variables clínicas estándar (eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, trombocitos, creatinina, sodio, potasio, ácido úrico, ostasa, CRP) en muestras de plasma y suero de acuerdo con los procedimientos estándar operativos de laboratorio (SOP). La muestra de suero para la evaluación de osteocalcina se centrifugó inmediatamente (3.500 rpm/15 minutos), se almacenó en alícuotas precongeladas y se envió al laboratorio dentro de tres horas.

Las citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 total, IL-10) se midieron en muestras de plasma utilizando un sistema semiautomático. Los anticuerpos y los reactivos respectivos para la tinción de citoquinas intracelulares se adquirieron de BD Pharmingen.

- 5 Se examinó el grupo de diferenciación relacionado con las células T para evaluar la inmunidad adaptativa de la defensa del huésped incluyendo CD3, CD4, CD8, CD11a+, CD57+ y CD28+. La clasificación de células se realizó usando el citómetro de flujo BD FACS Aria II y la pureza de las fracciones obtenidas se determinó en el citómetro de flujo BD LSR II.

#### Medio condicionado de células CD8+ TEMRA para diferenciación de MSC

- 10 Se obtuvieron medios condicionados de células CD8+ TEMRA activadas por receptor de células T (CD62L-CD45RA+) de dos donantes diferentes después del consentimiento informado y la aprobación de los comités de ética locales sobre estudios en humanos. Después del agotamiento de las células CD62L+ y CD45RO+, se realizó una selección positiva de células CD8+ de la fracción CD62L-CD45RO-. Las células T CD8+ ( $1 \times 10^6$  células/ml DMEM + 10 % FCS) se estimularon durante 24 horas con perlas recubiertas con CD3CD28CD2.

#### Aislamiento y cultivo de células del estroma mesenquimatoso derivadas de médula ósea (BM-MSC)

- 15 Las BM-MSC se aislaron de los lavados de la médula ósea femoral de cinco pacientes (edad del donante: 39-90 años, media= 73 años; género: 2 mujeres, 3 hombres) sometidos a cirugía de cadera como se describió anteriormente. Una población homogénea de BM-MSC se validó mediante el análisis de la expresión del marcador de la superficie celular usando análisis de citometría de flujo [Glaeser, J.D., S. Geissler, A. Ode, C.J. Schipp, G. Matziolis, W.R. Taylor, P. Knaus, C. Perka, G.N. Duda, and G. Kasper, Modulation of matrix metalloprotease-2 levels by mechanical loading of three-dimensional mesenchymal stem cell constructs: impact on in vitro tube formation. Tissue Eng Part A. 16(10): p. 3139-48 (2010)]. Todos los ensayos celulares descritos a continuación se realizaron con BM-MSC en los pasos 3-4 de al menos 4 donantes diferentes en tres réplicas técnicas.
- 20

#### Ensayo de diferenciación osteogénica

- 25 La diferenciación osteogénica de BM-MSC confluentes se indujo mediante el uso de medios osteogénicos (OM) complementados con diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , respectivamente. Para los experimentos con CM de CD8+ TEMRA clasificadas estimuladas ex vivo, las CM se diluyeron 1:2 con OM doblemente concentrado. La mineralización de la matriz se visualizó con tinción con rojo de alizarina. La cuantificación se logró midiendo la absorbancia de rojo de alizarina (ODAR) después de la extracción con cloruro de cetilpiridinio al 10 %. Los valores obtenidos se normalizaron al número de células viables determinadas por azul de alamar.

#### Ensayo de supervivencia y viabilidad de BM-MSC

- 30 Para el ensayo de viabilidad celular, se sembraron 2.400 BM-MSCs/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos un día antes del experimento. Al día siguiente, se intercambió el medio y las células se cultivaron en EM que contenía diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  (0, 1, 10 y 100 ng/ml) durante tres días. La viabilidad celular se midió usando el ensayo de viabilidad celular azul de alamar. La siembra de células iguales se confirmó un día después de la siembra usando el ensayo CyQuant de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 35

#### Ensayo de apoptosis BM-MSC

- 40 Para los ensayos de apoptosis celular, se sembraron 2.400 BM-MSCs/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos. Las BM-MSCs se cultivaron durante dos días con un medio que contenía la concentración indicada de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , respectivamente. Posteriormente, se eliminó el medio y se midieron las actividades de caspasa-3 y -7 en lisados celulares usando el ensayo Caspase-Glo® 3/7 de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los valores se normalizaron al número de células determinado por el ensayo CyQuant.

#### Experimentos con ratones

- 45 Los experimentos con ratones se realizaron con ratones C57BL/6 de 12 semanas de edad (n=19) de acuerdo con las políticas y principios establecidos por la Ley de Bienestar Animal, la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y las pautas nacionales de bienestar animal. El agotamiento de las células inmunes CD8+ en el grupo de células T CD8- se logró con una inyección de anticuerpo (mCD8 (YTS 169.4), BioXCell) (200  $\mu$ g de mCD8, por inyección durante cuatro días consecutivos, siendo el último día el día de la cirugía).

- 50 El agotamiento de células CD8+ se monitorizó mediante análisis FACS (citómetro de flujo LSR II) usando anticuerpos específicos contra CD3, CD8a y CD4. El grupo de células T CD8+ recibió una inyección intravenosa en la vena de la cola de 200  $\mu$ l con  $2.5 \times 10^6$  células CD8+ el día antes de la cirugía. La osteotomía se realizó en el fémur izquierdo utilizando el sistema MouseExFix. El fémur se sometió a un análisis  $\mu$ CT (Viva  $\mu$ CT 40) con un tamaño de vóxel de 10,5  $\mu$ m, 55 keVp, 145  $\mu$ A y el volumen de interés (VOI) incluyó 2 mm con la apertura de la osteotomía en el centro. El resultado de regeneración a los 21 días después de la osteotomía fue calificado como puenteado o no puenteado por tres cirujanos ortopédicos independientes en una evaluación cegada.

Clasificación de regeneración y recopilación de datos

Cada paciente se sometió a varios análisis de rayos X para evaluar la estabilidad del implante y la apertura de fractura durante el tiempo de estudio. El examen de las radiografías fue realizado por tres médicos independientes, cegados, de diferentes ramas (ortopedia, radiólogo), para asegurar el resultado de regeneración correcto y la clasificación de los pacientes. Además, se realizaron datos funcionales (análisis de la marcha) para evaluar el apoyo de peso completo indoloro después de 12 semanas post operación. Para cumplir con la definición de un proceso de regeneración retrasado, los pacientes deben cumplir uno o más de los siguientes criterios. Según lo establecido en la literatura y utilizado en clínicas, para un proceso de regeneración tardía existen criterios dependientes del tiempo y radiológicos.

10 Criterios dependientes del tiempo para la regeneración tardía de fracturas:

Una regeneración de fractura incompleta después de 12 semanas postoperatorias en base a la formación de callos.

Criterios radiológicos para la regeneración tardía de fracturas:

- 15
- 1) Una regeneración de fractura incompleta después de 12 semanas postoperatorias con una apertura de fractura de  $>1$  mm.
  - 2) La presencia de una zona de reabsorción o formación incompleta de callos.
  - 3) Un puentado incompleto, lo que significa una a tres cortezas puenteadas.
  - 4) No puentado, lo que significa que hay puente en la corteza.

Para cuantificar la situación postoperatoria individual del paciente, se utilizó el sistema de puntaje de Calori sin unión.

- 20
- Además, los datos demográficos de los pacientes, la clasificación ASA, el diagnóstico principal, el tipo de operación e implante, las enfermedades concomitantes y los datos microbiológicos se derivaron de los gráficos y se recopilaron en una base de datos. Todas las características del paciente se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: características del paciente

| No. Pac. | Edad | Peso (kg) | Altura (cm) | BMI    | Fumador | Estado de regeneración |
|----------|------|-----------|-------------|--------|---------|------------------------|
| 1        | 47   | 60        | 159         | 23,733 | sí      | retrasado              |
| 2        | 62   | 90        | 183         | 26,874 | no      | normal                 |
| 4        | 57   | 53        | 153         | 22,641 | no      | retrasado              |
| 5        | 39   | 80        | 168         | 28,345 | no      | normal                 |
| 7        | 59   | 62        | 158         | 24,836 | no      | retrasado              |
| 8        | 23   | 75        | 192         | 20,345 | sí      | normal                 |
| 9        | 58   | 97        | 168         | 34,368 | sí      | normal                 |
| 10       | 24   | 60        | 159         | 23,733 | sí      | normal                 |
| 11       | 46   | 80        | 176         | 25,826 | sí      | normal                 |
| 12       | 45   | 92        | 188         | 26,03  | No      | retrasado              |
| 13       | 46   | 86        | 174         | 28,405 | sí      | normal                 |
| 14       | 62   | 66        | 162         | 25,149 | No      | retrasado              |

(continuación)



| No. Pac. | Edad | Peso (kg) | Altura (cm) | BMI    | Fumador | Estado de regeneración |
|----------|------|-----------|-------------|--------|---------|------------------------|
| 16       | 25   | 90        | 185         | 26,297 | No      | normal                 |
| 17       | 49   | 81        | 172         | 27,38  | sí      | retrasado              |
| 18       | 64   | 70        | 180         | 21,605 | No      | retrasado              |

#### Análisis de la marcha

Se realizó un análisis de movimiento en 3-D utilizando 12 cámaras infrarrojas a una tasa de muestreo de 120 Hz y marcadores retrorreflectivos que se unieron a la piel en la cabeza del primer y quinto metatarsianos y el talón. Las

En cada día de prueba, los pacientes realizaron una caminata a lo largo de una pasarela de 10 m con velocidad autoseleccionada. Los datos cinemáticos permitieron el cálculo de los parámetros de la marcha, como la velocidad de la marcha, la longitud del paso y la zancada, la cadencia, la altura de la zancada y la duración de la fase de balanceo y postura. Además, se tomaron las fuerzas de reacción del suelo para calcular la fuerza horizontal máxima y la duración de la postura para el miembro afectado y el miembro contralateral.

Los pacientes también realizaron una prueba desde postura sentada a postura de pie, desde una silla con cada pie colocado en una plataforma de fuerza separada para determinar las diferencias en la fuerza máxima entre las extremidades, así como la duración de la prueba desde postura sentada a postura de pie, reflejada por la fuerza de reacción del suelo.

#### Análisis estadístico

Todos los datos se dan como media  $\pm$  desviación estándar. La prueba de chi-cuadrado se aplicó para evaluar la dependencia de la edad y el género entre los grupos y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar aquellos valores que normalmente no se distribuían. La prueba de Mann-Whitney-U se utilizó para la comparación entre grupos. Se aplicaron medidas repetidas ANOVA con corrección de Bonferroni para escanear las variables de cada grupo entre los diferentes puntos de tiempo del estudio.

Se realizó un análisis de las características de operación del receptor (curva ROC) para todos los genes expresados de manera diferente entre los dos grupos de pacientes. Para la estimación de valores predictivos positivos y negativos, se aplicó la sensibilidad y especificidad para cada gen derivado del análisis de la curva ROC.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, Estados Unidos). La significación estadística se indicó en  $p < 0,05$ .

Cada diagrama de caja muestra la mediana, el cuartil inferior y superior.

Niveles de significación:  $p < 0,05$  = \*/ $p < 0,01$  = \*\*/ $p < 0,0001$  = \*\*\*

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1: puntaje de Calori**

Los pacientes con regeneración normal y tardía fueron similares en edad, género, altura y peso. No hubo diferencias en la clasificación ASA, la calidad ósea, la apertura de defectos óseos, la técnica de operación, el número de intervenciones y el tabaquismo entre los grupos.

El puntaje de Calori se calcula mediante los siguientes factores, en los que los factores se resumen y multiplican por dos.

##### a) Factores óseos:

calidad ósea      buena (0 Pt), moderada (por ejemplo, osteoporótico leve, 1 Pt), mala (por ejemplo, pérdida ósea, 2 Pt), muy mala (por ejemplo, necrótico, avascular 3 Pt.)

fractura          cerrada (0 Pt), abierta 1 grado (1 Pt), abierta 2-3 grados grado A (3 Pt), abierta 3

|                        |                                                                                                                                                                                    |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| primaria               | grados grado B-C (5 Pt)                                                                                                                                                            |
| intervención adicional | ninguna (1 Pt), <2 (2 Pt), <4 (3 Pt), >4 (4 Pt)                                                                                                                                    |
| Invasividad OP         | mínimamente invasivo (por ejemplo, tornillos, 0 Pt), intramedular interno (por ejemplo, clavo, 1 Pt), extramedular interno (2 Pt), osteosíntesis (por ejemplo, injerto óseo, 3 Pt) |
| Idoneidad OP           | estabilidad adecuada (0 Pt), estabilidad inadecuada (1 Pt)                                                                                                                         |
| Weber y Cech           | hipertrofia (1 Pt), oligotrofia (3 Pt), atrofia (5 Pt)                                                                                                                             |
| orientación ósea       | anatómico (0 Pt), no anatómico (1Pt)                                                                                                                                               |
| apertura fractura      | de 0,5-1 cm (2 Pt), 1-3 cm (3Pt), >3 cm (5 Pt)                                                                                                                                     |

b) Tejido blando

Estado intacto (0 Pt), tratamiento reciente sin eventos (2 Pt), tratamiento reciente de un defecto tisular (por ejemplo, incisiones múltiples, síndrome de compartimentos, 3 Pt), tratamiento complejo reciente (4 Pt), mala vascularización (insuficiencia venosa, llenado capilar malo, 5 Pt), lesiones o defectos múltiples de la piel (por ejemplo, úlceras, aparición de placas de implantes 6 Pt)

5 c) Paciente

|                    |                                                                                       |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Grado ASA          | 1 grado o 2 grados (0 Pt), 3 grados o 4 grados (1 Pt)                                 |
| diabetes           | no (0 Pt), sí: bien controlado = HbA1c <10 (1 Pt), si: mal controlado HbA1c >10 (2Pt) |
| análisis de sangre | inflamación WCC >12 o ESR >20 o CRP >20 (1 Pt)                                        |
| infecciones        | ninguna (0 Pt), infección reciente o sospecha de infección (1 Pt), séptico (4 Pt)     |
| medicación         | esteroides (1 Pt), no esteroideos (1 Pt)                                              |
| fumador            | no (0 Pt), si (5 Pt).                                                                 |

Los pacientes con regeneración tardía tenían un defecto de tejido blando más alto con un tratamiento más complejo, un estado de infección clínica más alto y recibieron más fármacos antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos (tabla 2).

10

| Parámetro                                             | Pacientes con regeneración tardía |       | Pacientes con regeneración normal |       |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| Lesión primaria (cerrada)                             | 100 %                             | (7/7) | 100 %                             | (8/8) |
| Fractura Tipo AO-B                                    | 57,1 %                            | (4/7) | 62,5 %                            | (5/8) |
| Fractura Tipo Moore                                   | 42,9 %                            | (3/7) | 37,5 %                            | (3/8) |
| ASA clase uno o dos                                   | 100 %                             | (7/7) | 100 %                             | (8/8) |
| Weber y Cech (hipertrófico)                           | 14,3 %                            | (1/7) | 25 %                              | (2/8) |
| Weber y Cech (oligotrófico)                           | 85,7 %                            | (6/7) | 75 %                              | (6/8) |
| Brecha de defecto óseo (0,5-1,0 cm)                   | 57,1 %                            | (4/7) | 75 %                              | (6/8) |
| Brecha de defecto óseo (1,0-3,0 cm)                   | 42,9 %                            | (3/7) | 25 %                              | (2/8) |
| Procedimiento quirúrgico (percutáneo)                 | 0 %                               | (0/7) | 12,5 %                            | (1/8) |
| Procedimiento quirúrgico (clavo)                      | 0 %                               | (0/7) | 12,5 %                            | (1/8) |
| Procedimiento quirúrgico (ORIF)                       | 100 %                             | (7/7) | 75 %                              | (6/8) |
| Número de intervenciones (<2)                         | 85,7 %                            | (6/7) | 100 %                             | (8/8) |
| Número de intervenciones (2-4)                        | 14,3 %                            | (1/7) | 0 %                               | (0/8) |
| Calidad del hueso (buena)                             | 71,4 %                            | (5/7) | 87,5 %                            | (7/8) |
| Calidad del hueso (moderada)                          | 28,6 %                            | (2/7) | 12,5 %                            | (1/8) |
| Defecto de tejido blando (cirugía sin complicaciones) | 14,3 %                            | (1/7) | 87,5 %                            | (7/8) |
| Defecto de tejido blando (tratamiento pequeño)        | 28,6 %                            | (2/7) | 12,5 %                            | (1/8) |
| Defecto de tejido blando (tratamiento complejo)       | 42,9 %                            | (3/7) | 0 %                               | (0/8) |
| Defecto de tejido blando (vascularización deficiente) | 14,3 %                            | (1/7) | 0 %                               | (0/8) |
| Estado de infección clínica (limpio)                  | 85,7 %                            | (6/7) | 100 %                             | (8/8) |
| Estado de infección clínica (previamente infectado)   | 14,3 %                            | (1/7) | 0 %                               | (0/8) |
| Terapia con esteroides/NSAID                          | 14,3 %                            | (1/7) | 0 %                               | (0/8) |
| Estado de tabaquismo                                  | 25 %                              | (1/7) | 37,5 %                            | (3/8) |

La figura 1 muestra el "puntaje de Calori", que refleja el riesgo de complicaciones de regeneración postoperatorias, fue significativamente mayor en los pacientes con regeneración tardía en comparación con los pacientes con regeneración normal (puntaje  $32,6 \pm 6,3$  vs.  $25,8 \pm 5,1$ ;  $p = 0,05$ ).

## 5 Ejemplo 2: análisis de la marcha

Los análisis de la marcha se realizaron después de 6, 12 y 18 semanas postoperatorio para evaluar el estado funcional de los pacientes (Figura 2). De este modo, los pacientes con regeneración tardía mostraron una velocidad de marcha significativamente menor y una fuerza de reacción máxima en el suelo que confirma la clasificación radiológica de los dos grupos diferentes. Además, muestra claramente el tiempo de regeneración prolongado en el grupo de regeneración tardía. Sorprendentemente, solo en la semana 18 postoperatoriamente, los pacientes con regeneración tardía alcanzan los niveles de velocidad de caminata de la sexta semana postoperatoria en el grupo de regeneración normal.

## Ejemplo 3: frecuencia de células CD8+/CD4+ en la población de células T CD3+

Se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de CD8+/CD4+ en las células T CD3+ entre los dos grupos (Figura 3). Los pacientes con regeneración tardía mostraron un porcentaje persistente más alto de CD8+/CD4+ en las células T CD3+ en todos los puntos de tiempo en comparación con los pacientes con regeneración normal. Además, no se observaron cambios en el porcentaje de CD8+/CD4+ de las células T CD3+ en

ambos grupos a lo largo del tiempo. Los valores de célula individual para cada grupo y punto de tiempo se muestran en la tabla 3.

#### **Ejemplo 4: frecuencia de células CD11a++ en la población de células T CD8+**

La expresión de las células T CD11a++ en el grupo de regeneración tardía fue significativamente mayor en comparación con los pacientes con regeneración normal durante el tiempo de estudio completo de 18 semanas. (Figura 4). Además, los pacientes con regeneración tardía mostraron niveles de células T CD11a++ patológicamente mejorados en comparación con el intervalo de referencia (línea discontinua). Además, mostraron valores significativamente más altos en comparación con un grupo de control sano no fracturado. Se evaluaron 3 pacientes con regeneración tardía y 3 con regeneración normal 60 semanas después de la cirugía. Ambos grupos mostraron la misma concentración de células T CD11a++. No se encontraron diferencias en cada grupo con el tiempo. Los valores de células individuales para cada grupo y punto de tiempo se muestran en la tabla 4. En la figura 12 se muestra un ejemplo para dos mediciones y análisis diferentes de la fracción CD11a++ (positivo alto) y CD11a+ (positivo) en pacientes humanos.

#### **Ejemplo 5: frecuencia de células CD57+ en la población de células T CD8+**

Se observaron diferencias significativas para la expresión de CD57+ en las células T CD8+ entre pacientes con regeneración tardía y regeneración normal (Figura 5). Sorprendentemente, los pacientes con regeneración tardía mostraron porcentajes de CD57+ 55 %-73 % más altos en comparación con los pacientes con regeneración normal o los valores normales de las personas sanas. Además, los pacientes con regeneración normal estaban dentro del intervalo de referencia, mientras que los pacientes con regeneración tardía mostraron niveles de CD8+CD28- por consiguiente, por encima de este intervalo de referencia (línea discontinua). Además, estas diferencias fueron estables durante el tiempo de estudio completo de 18 semanas. Comenzando con una ligera diferencia en la primera semana postoperatoria, estas diferencias se volvieron significativas durante la segunda semana de hospitalización. Durante el tiempo de estudio, no se encontraron cambios de CD8+CD57+ dentro de cada grupo, lo que refleja más bien la experiencia inmune individual que la reacción a la fractura. Los valores de células individuales para cada grupo y punto de tiempo se muestran en la tabla 5.

#### **Ejemplo 6: frecuencia de células CD28- en la población de células T CD8+**

Secuencias similares se muestran por las células T CD8+CD28- (Figura 6). Aquí, los pacientes con regeneración tardía mostraron niveles persistentes más altos de células T CD8+CD28- de 29 %-34 %, en comparación con pacientes con regeneración normal o valores de personas sanas, respectivamente. De manera similar a los resultados de las células T CD8+CD57+, las diferencias en los porcentajes de células T CD8+CD28- se hicieron significativas durante la segunda semana de hospitalización y estas diferencias también fueron estables durante todo el tiempo de estudio y 60 semanas después de la cirugía. Además, no se observaron diferencias significativas dentro de cada grupo durante el estudio. Los valores de células individuales para cada grupo y punto de tiempo se muestran en la tabla 6.

#### **Ejemplo 7: expresión de citoquinas IL-6, IL-8, TNF $\alpha$**

Los niveles de IL-6 disminuyeron significativamente entre la primera y la segunda semana postoperatoria en ambos grupos (pacientes con regeneración tardía  $p = 0,03$ ; pacientes con regeneración normal  $p = 0,003$ ) (Figura 7). Sin embargo, los niveles de IL-6 de los pacientes con cicatrización tardía después de la segunda semana postoperatoria continuaban mas altos, en comparación con los niveles de IL-6 de los pacientes con regeneración normal en la primera semana postoperatoria. Los valores de células individuales para cada grupo y punto de tiempo se muestran en la tabla 7.

No hubo diferencias significativas en los niveles de IL-8 entre los grupos, pero los niveles de IL-8 disminuyeron significativamente de la primera a la segunda semana postoperatoria en ambos grupos (pacientes con regeneración tardía  $281,4 \pm 162,7$  vs.  $195,4 \pm 77,3$  pg/ml;  $p = 0,04$  y pacientes con regeneración normal  $219,3 \pm 66,8$  vs.  $182,9 \pm 55,9$  pg/ml;  $p = 0,01$ ).

Para los niveles de TNF $\alpha$ , no se observaron diferencias entre y dentro de ambos grupos durante el tiempo de estudio.

#### **Ejemplo 8: migración de CD8+ TEMRA de la sangre periférica al hematoma**

El hematoma de fractura representa la fase inicial en la regeneración de la fractura y, por lo tanto, podría ser un elemento clave para guiar el resultado de la regeneración. Por lo tanto, se investigó si el subconjunto CD8+TEMRA podría enriquecerse en el sitio de la fractura debido a su alta expresión molecular de adhesión (por ejemplo, CD11a). Se analizaron pares de muestras de sangre periférica y de hematoma de fractura de otros cuatro pacientes con una fractura de tibia proximal cerrada (Figura 8). Los análisis de subconjuntos revelaron un enriquecimiento de CD28-CD8+TEMRA en el hematoma de fractura de todos los pacientes por un factor de 1,8-2,5 ( $p < 0,05$ ) en comparación con la sangre periférica. Se encontraron resultados similares para el subconjunto CD57+CD8+TEMRA, que varía de 1,4 a 3,7 veces de enriquecimiento ( $p = 0,07$ ).

**Ejemplo 9: fuerte producción de IFN- $\gamma$  por células CD8+ TEMRA**

Se cree que las células CD8+ TEMRA son fuertes productores de citoquinas. De hecho, después de la estimulación ex vivo de células T por mAb anti-CD3/28 recubierto con placa, se observó la respuesta de citoquina más fuerte (>50 % de células productoras de IFN- $\gamma$ ) dentro del subconjunto CD3+8+57+28- en comparación con otros subconjuntos de células T (células T CD4+, CD8+ total, CD8+57-28+; 18-35 % de células productoras de IFN- $\gamma$ ) (Figura 9). Curiosamente, los MSC humanos derivados de la médula ósea (BM-MSC) que se sabe que juegan un papel clave en la regeneración ósea y son capaces de inhibir la proliferación de células T, no pudieron suprimir la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T de memoria, lo que demuestra la resistencia de esas células inmunes a las señales negativas por factores tisulares (Figura 9).

**Ejemplo 10: inhibición de la osteogénesis de las células del estroma mesenquimatoso de la médula ósea por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$** 

A continuación, se examinó el efecto de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en las células óseas utilizando ensayos de viabilidad y diferenciación osteogénica in vitro.

La figura 10 muestra que las células T (CD3+8+) CD11a++, CD57+ y CD28- inhiben la osteogénesis de BM-MSC a través de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Las figuras 10 B y C) muestran imágenes representativas (panel superior) de BM-MSC después del tratamiento con medio osteogénico suplementado con las concentraciones indicadas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , respectivamente. Los diagramas muestran valores de densidad óptica de rojo de alizarina (OD<sub>AR</sub>) normalizados al número de células. Las figuras 10. D y E) muestran la vitalidad de BM-MSC determinada con azul de alamar<sup>(R)</sup> después del cultivo en medios complementados con las concentraciones de citoquinas indicadas. La figura 10 F) muestra el valor de fluorescencia relativa del ensayo Caspase-Glo<sup>TM</sup> 3/7 normalizado al contenido de ADN total determinado por CyQuant<sup>TM</sup>. La figura 10 G) muestra la mineralización de la matriz de BM-MSC después del cultivo en medios condicionados (CM) de CD8+ TEMRA clasificadas estimuladas ex vivo en relación con el control correspondiente sin CM. Para a-f n=4 y g n=3. Análisis de varianza con corrección de Bonferroni \* P<0,05, \*\* P<0,01, # P<0,05 de células tratadas con CM versus control no tratado. La línea discontinua indica el valor del control no tratado.

La adición de ambas citoquinas inhibió la diferenciación osteogénica de las BM-MSC humanas de manera dependiente de la concentración (Figura 10A y 10B). Curiosamente, la TNF- $\alpha$  pero no la IFN- $\gamma$  redujo significativamente la viabilidad de las BM-MSC humanas a concentraciones de 10-100 ng/ml (Figura 10C y 10D). Para confirmar esta observación, se determinó la tasa de apoptosis (Figura 10E). Como se esperaba, la TNF- $\alpha$  aumentó de forma dependiente de la dosis la actividad de caspasa3/7 en BM-MSC humanas, mientras que la IFN- $\gamma$  no tuvo efecto.

Para investigar más a fondo el posible vínculo entre las células CD8+ TEMRA, su secreción específica de citoquinas y su efecto negativo sobre la mineralización de la matriz, se utilizaron medios condicionados (CM) de CD8+ TEMRA clasificadas estimuladas ex vivo. Durante la diferenciación osteogénica, se cultivaron BM-MSC en CM, diluidas con 1:2 con medios osteogénicos doblemente concentrados. De antemano, se determinaron las concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en CM (Donante 1: C<sub>IFN- $\gamma$</sub> =1,6 ng/ml, C<sub>TNF- $\alpha$</sub> =1,8 ng/ml; Donante 2: C<sub>IFN- $\gamma$</sub> = 2,1 ng/ml, C<sub>TNF- $\alpha$</sub> =5,1 ng/ml) y se encontró que aumentaban claramente en comparación con el CM de las células no estimuladas (Donante 2: C<sub>IFN- $\gamma$</sub> =0,4 ng/ml, C<sub>TNF- $\alpha$</sub> =0,2 ng/ml).

CM de células CD8+ TEMRA estimuladas ex vivo de ambos donantes inhibió por completo la diferenciación BM-MSC, mientras que CM de células CD8+ TEMRA no estimuladas no mostró ningún efecto significativo en comparación con los medios osteogénicos estándar (Figura 10F-H). Además, la adición de anticuerpos neutralizantes contra IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  al CM de las células CD8+ TEMRA estimuladas aumentó ligeramente la mineralización de la matriz. La combinación de ambos anticuerpos, sin embargo, revirtió casi por completo la mineralización de la matriz de BM-MSC.

En sumario, estos resultados mostraron que tanto IFN- $\gamma$  como TNF- $\alpha$  son capaces de inhibir la osteogénesis y, por lo tanto, potencialmente contribuyen al retraso en la regeneración ósea. El efecto inhibitor de TNF- $\alpha$  parece ser el resultado de, al menos en parte, la inducción de apoptosis, mientras que IFN- $\gamma$  podría interferir directamente con la diferenciación osteogénica.

**Ejemplo 11: el agotamiento de CD8+ mejora la regeneración de la fractura ósea en un modelo de ratón**

La posible relación causal entre el enriquecimiento de las células T CD8+ de memoria y la patogénesis de la regeneración deficiente de fracturas óseas, se investigó más a fondo en un modelo de ratón.

La Figura 11 muestra que el agotamiento de CD8+ en ratones mejora la regeneración de la fractura ósea en la que A) muestra el nivel de CD8+ de las células T CD3+TCR $\alpha/\beta$  en la médula ósea (BM) de los animales con células T CD8+ agotadas (CD8-, n=6), animales con espectro inmunitario inalterado (WT, n=6), animales alojados en condiciones semiestériles (WTexp, n=4) y animales con transferencia adaptativa de células T CD8+ (CD8+, n=3), B) muestra la cantidad de CD62L-CD8+ de células T CD3+ en el BM de los grupos indicados. C y D) muestran los resultados de la evaluación cuantitativa de  $\mu$ CT para los grupos descritos en A y E-H) muestra imágenes

representativas de  $\mu$ CT para los grupos indicados. Análisis de varianza con corrección de Bonferroni \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

En el primer grupo de animales, las células CD8+ se agotaron mediante una terapia con anticuerpos (grupo CD8-), que se esperaba que resultara en un mejoramiento de la regeneración ósea. El agotamiento exitoso se confirmó en la sangre por citometría de flujo. Se logró un agotamiento de células T CD8+ casi completo el día de la cirugía con una recuperación parcial durante el período de regeneración de 21 días (agotamiento previo CD3+CD8+ 20,8 %, día de la cirugía CD3+CD8+ 0,07 %, día 21 CD3+CD8+ 6,1 %). El segundo grupo tenía un espectro de células inmunes inalteradas (grupo WT,  $n=6$ ) y se criaron y mantuvieron bajo condiciones específicas de alojamiento tipo barrera libre de patógenos (SPF). En este grupo, el sistema inmune de los animales tenía un contacto muy limitado con los patógenos y, por lo tanto, solo un bajo porcentaje de células T de memoria CD62L-CD8+. En el tercer grupo (WT), los ratones fueron alojados bajo condiciones semiestériles sin una barrera durante al menos cuatro semanas. Estos animales estuvieron ampliamente expuestos a patógenos, lo que resultó en niveles mejorados de células T de memoria CD62L-CD8+. El último grupo (CD8+) recibió una transferencia adaptativa de células T CD8+ para aumentar aún más el número de células T CD8+. Después de 21 días post cirugía, se determinó la cantidad de células T CD8+ en la médula ósea. Como se esperaba, el porcentaje de células T CD8+ fue claramente menor en el grupo CD8- en comparación con todos los otros grupos (Figura 11a). Además, las células T CD8+ en BM aumentaron progresivamente del grupo CD8- ( $13 \pm 6,6$ ), grupo WT ( $30 \pm 5,8$ ), grupo WTexp ( $37 \pm 2,8$ ), a los porcentajes más altos detectados en el grupo CD8+ ( $40 \pm 3,6$ ). Se encontraron resultados similares para la subpoblación de células T de memoria CD62L-CD8+, que también fueron significativamente más bajas en el grupo CD8- en comparación con todos los otros grupos (Figura 11b).

En consecuencia, la evaluación  $\mu$ CT de la calidad del callo de fractura mostró una disminución progresiva en la proporción de volumen óseo a volumen total (BV/TV) y la densidad de volumen óseo del grupo CD8- al grupo CD8+ (Figura 11 c-h). Estos resultados proporcionan evidencia de una relación causal entre el enriquecimiento de la memoria de las células T CD8+ y una calidad ósea más baja.

#### **Ejemplo 12: células CD57+ en la población de células T CD8+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).**

La figura 13 muestra que este fenotipo celular no está influenciado por la intervención quirúrgica como se refleja en valores pre y postoperatorios similares y, por lo tanto, es adecuado como marcador de pronóstico preoperatorio. Además, utilizando el valor límite retrospectivo calculado para el pronóstico de la regeneración tardía de la fractura, se puede esperar un proceso de regeneración tardía en tres de los pacientes (marcado con una flecha).

Por lo tanto, la frecuencia de las células CD8+CD57+ en la sangre y el hematoma de fractura es una medida adecuada para los procedimientos de regeneración tardía en pacientes con fractura de hueso largo.

#### **Ejemplo 13: células CD28- en la población de células T CD8+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).**

Se encontraron resultados similares para las células T CD45+3+8+28- (Figura 14). Nuevamente, este fenotipo no está influenciado por la intervención quirúrgica y se puede esperar un proceso de regeneración tardía en los mismos tres pacientes como se describió anteriormente.

#### **Ejemplo 14: La frecuencia de células CD57+ y células CD28- en la población de células T CD4+ de pacientes con fractura ósea en la sangre antes y después de la cirugía y en el hematoma de fractura (FH).**

Las células CD8+ TEMRA juegan un papel negativo importante en el procedimiento de regeneración de fracturas. Por lo tanto, las células T efectoras/de memoria y reguladoras (Tregs) mejoran el proceso de regeneración que conduce a un resultado de regeneración más temprano y exitoso. La figura 15 muestra que estas células no están influenciadas por la intervención quirúrgica y encontraron una migración significativa hacia el hematoma de fractura.

#### **Concepto y evidencia**

La regeneración tardía o incluso incompleta (regeneración sin unión) de los huesos largos afecta aproximadamente al 5-10 % de los pacientes y se asocia con un mal resultado a largo plazo con un alto impacto socioeconómico. En la presente invención, el 41 % de los pacientes reclutados mostraron una regeneración tardía como se refleja por la apertura de fractura o la formación de callos y la función física reducida más de 18 semanas después de la intervención de cirugía primaria. Sorprendentemente, la velocidad de marcha en la 18ª semana postoperatoria de los pacientes con regeneración tardía fue comparable con los niveles de la 6ª semana postoperatoria en el grupo de regeneración normal.

Lo más importante es que la regeneración tardía se asoció fuertemente con una reacción inflamatoria amplificada y prolongada con una frecuencia significativamente mejorada ( $>2$  veces) de células T efectoras CD8+ diferenciadas terminalmente que expresan el fenotipo CD3+8+11 a++28-57+ (CD8+ TEMRA). Esta diferencia fue estable a lo largo del tiempo, reflejando más bien la experiencia inmune individual que la reacción a la fractura.

Los linfocitos que expresan CD8+CD57+ se expanden en infecciones crónicas (virales) en etapa tardía por desregulación de la vía apoptótica normal. Se supone que las intervenciones clínicas desempeñan un papel importante en el curso de regeneración de los pacientes. En el estudio presente aquí, no se encontraron diferencias en el número de intervenciones, procedimientos quirúrgicos o calidad ósea entre los dos grupos.

- 5 Además, los defectos severos de los tejidos blandos inducidos por la lesión se conocen comúnmente en las fracturas tibiales y pueden dar una indicación adicional de que el paciente es de alto riesgo y pueden beneficiarse de la evaluación de este riesgo por el procedimiento de la presente invención.

Independientemente del número pequeño de pacientes, los datos demuestran que el perfil inmune individual (frecuencia de CD8+TEMRA) es un biomarcador confiable para predecir el resultado de la regeneración de fracturas óseas que permite intervenciones tempranas.

10

Tabla 3 (todos los tiempos dados post operación; TC: células T)

| No. Pac. | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 1 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 2 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 4 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 6 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 12 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ semana 18 | TC CD4+CD8+ como % TC CD3+ mes 15 |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 1        | 3,01                                | 2,32                                | .                                   | .                                   | .                                    | .                                    | .                                 |
| 2        | 0,87                                | 0,9                                 | 0,57                                | 0,85                                | 0,69                                 | 3,62                                 | .                                 |
| 4        | 0,52                                | 0,84                                | 0,93                                | 1,14                                | 0,84                                 | 1,35                                 | 1,22                              |
| 5        | 0,76                                | 0,53                                | 0,52                                | 1,15                                | 1,36                                 | 1,11                                 | .                                 |
| 7        | 1,88                                | 2,46                                | 3,26                                | 2,4                                 | 2,44                                 | 4,27                                 | .                                 |
| 8        | 0,45                                | 0,84                                | 1,07                                | 0,47                                | 0,62                                 | 0,64                                 | .                                 |
| 9        | 0,55                                | 0,48                                | 0,44                                | 0,37                                | 0,84                                 | 0,55                                 | .                                 |
| 10       | 0,92                                | 1,33                                | 2,13                                | 1,01                                | 1,42                                 | 0,86                                 | 1,25                              |
| 11       | 4,11                                | 4,16                                | 4,07                                | 4,38                                | 3,83                                 | 4,33                                 | .                                 |
| 12       | 1,55                                | 1,66                                | 1,84                                | 1,32                                | 1,35                                 | 1,85                                 | .                                 |
| 13       | 2,72                                | 3,16                                | 3,47                                | 2,61                                | 2,97                                 | 3,17                                 | .                                 |
| 14       | 11,6                                | 13,27                               | 9,47                                | 7,65                                | 8,28                                 | 10,55                                | 11,67                             |
| 16       | 0,71                                | 1                                   | 0,6                                 | 0,86                                | 0,83                                 | 0,94                                 | 0,56                              |
| 17       | 1,62                                | 2,79                                | 2,24                                | 1,84                                | 1,89                                 | 1,78                                 | .                                 |
| 18       | 28,96                               | 26,12                               | 27,19                               | 23,77                               | 18,94                                | 19,56                                | 21,26                             |

Tabla 4 (todos los tiempos dados post operación; TC: células T)

# ES 2 760 977 T3

| No. Pac. | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 1 | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 2 | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 4 | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 6 | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 12 | CD11a+ como % de TC CD8+ semana 18 | CD11a+ como % de TC CD8+ mes 15 |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 1        | 66                                | 60                                | .                                 | .                                 | .                                  | .                                  | .                               |
| 2        | 60                                | 69                                | .                                 | 64                                | 67                                 | 76                                 | .                               |
| 4        | 78                                | 81                                | 84                                | 87                                | 87                                 | 91                                 | 88                              |
| 5        | 63                                | 64                                | 63                                | 69                                | 71                                 | 61                                 | .                               |
| 7        | 84                                | 85                                | 88                                | 85                                | 91                                 | 86                                 | .                               |
| 8        | 29                                | 33                                | 38                                | 30                                | 28                                 | 28                                 | .                               |
| 9        | 43                                | 62                                | 75                                | 48                                | 57                                 | 63                                 | .                               |
| 10       | 49                                | 40                                | 38                                | 45                                | 36                                 | 46                                 | 38                              |
| 11       | 67                                | 66                                | 67                                | 69                                | 65                                 | 67                                 | .                               |
| 12       | 66                                | 68                                | 64                                | 72                                | 62                                 | 62                                 | .                               |
| 13       | 48                                | 46                                | 46                                | 42                                | 44                                 | 47                                 | .                               |
| 14       | 78                                | 84                                | 79                                | 70                                | 75                                 | 79                                 | 79                              |
| 16       | 58                                | 49                                | 52                                | 47                                | 49                                 | 45                                 | 52                              |
| 17       | 74                                | 76                                | 71                                | 78                                | 77                                 | 78                                 | .                               |
| 18       | 92                                | 87                                | 90                                | 90                                | 88                                 | 88                                 | 86                              |

Tabla 5 (todos los tiempos dados post operación; TC: células T)

| No. Pac. | CD57+ como % de TC CD8+ semana 1 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 2 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 4 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 6 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 12 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 18 | CD57+ como % de TC CD8+ mes 15 |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1        | 56                               | 48                               | .                                | .                                | .                                 | .                                 | .                              |
| 2        | 52                               | 44                               | .                                | 32                               | 40                                | 42                                | .                              |
| 4        | 20                               | 27                               | 38                               | 31                               | 35                                | 39                                | 29                             |



(continuación)

| No. Pac. | CD57+ como % de TC CD8+ semana 1 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 2 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 4 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 6 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 12 | CD57+ como % de TC CD8+ semana 18 | CD57+ como % de TC CD8+ mes 15 |
|----------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 5        | 30                               | 30                               | 29                               | 41                               | 30                                | 30                                | .                              |
| 7        | 24                               | 28                               | 33                               | 35                               | 32                                | 33                                | .                              |
| 8        | 7                                | 8                                | 6                                | 4                                | 5                                 | 4                                 | .                              |
| 9        | 12                               | 13                               | 18                               | 18                               | 17                                | 16                                | .                              |
| 10       | 5                                | 6                                | 6                                | 5                                | 6                                 | 6                                 | 2                              |
| 11       | 23                               | 22                               | 21                               | 16                               | 16                                | 22                                | .                              |
| 12       | 39                               | 38                               | 38                               | 46                               | 32                                | 36                                | .                              |
| 13       | 36                               | 23                               | 20                               | 22                               | 23                                | 27                                | .                              |
| 14       | 52                               | 51                               | 48                               | 40                               | 44                                | 50                                | 43                             |
| 16       | 39                               | 28                               | 32                               | 29                               | 32                                | 31                                | 29                             |
| 17       | 36                               | 40                               | 36                               | 37                               | 36                                | 37                                | .                              |
| 18       | 74                               | 72                               | 73                               | 68                               | 59                                | 59                                | 45                             |

Tabla 6 (todos los tiempos dados post operación; TC: células T)

| No. Pac. | CD28- en % de TC CD8+ semana 1 | CD28- en % de TC CD8+ semana 2 | CD28- en % de TC CD8+ semana 4 | CD28- en % de TC CD8+ semana 6 | CD28- en % de TC CD8+ semana 12 | CD28- en % de TC CD8+ semana 18 | CD28- en % de TC CD8+ mes 15 |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1        | 59                             | 49                             |                                |                                |                                 |                                 |                              |
| 2        | 60                             | 54                             |                                | 40                             | 49                              | 56                              |                              |
| 4        | 24                             | 34                             | 55                             | 41                             | 46                              | 49                              | 40                           |
| 5        | 34                             | 34                             | 32                             | 34                             | 33                              | 35                              |                              |
| 7        | 33                             | 31                             | 35                             | 37                             | 35                              | 40                              |                              |
| 8        | 10                             | 11                             | 12                             | 10                             | 9                               | 10                              |                              |
| 9        | 11                             | 14                             | 14                             | 18                             | 16                              | 16                              |                              |

(continuación)

| No. Pac. | CD28- en % de TC CD8+ semana 1 | CD28- en % de TC CD8+ semana 2 | CD28- en % de TC CD8+ semana 4 | CD28- en % de TC CD8+ semana 6 | CD28- en % de TC CD8+ semana 12 | CD28- en % de TC CD8+ semana 18 | CD28- en % de TC CD8+ mes 15 |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 10       | 16                             | 16                             | 16                             | 12                             | 19                              | 14                              | 11                           |
| 11       | 17                             | 20                             | 12                             | 12                             | 16                              | 17                              |                              |
| 12       | 39                             | 43                             | 41                             | 46                             | 32                              | 40                              |                              |
| 13       | 29                             | 25                             | 20                             | 20                             | 26                              | 28                              |                              |
| 14       | 59                             | 56                             | 50                             | 46                             | 51                              | 56                              | 56                           |
| 16       | 40                             | 29                             | 32                             | 30                             | 32                              | 35                              | 40                           |
| 17       | 39                             | 40                             | 36                             | 37                             | 38                              | 37                              |                              |
| 18       | 78                             | 75                             | 77                             | 71                             | 62                              | 63                              | 63                           |

Tabla 7 (todos los tiempos dados post operación)

| No. Pac. | IL-6 en pg/ml semana 1 | IL-6 en pg/ml semana 2 | IL-6 en pg/ml semana 4 | IL-6 en pg/ml semana 6 | IL-6 en pg/ml semana 12 | IL-6 en pg/ml semana 18 | IL-6 en pg/ml mes 15 |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| 1        | 31,2                   | 7,6                    |                        |                        |                         |                         |                      |
| 2        | 4,8                    | 3,9                    | 2                      | 2                      | 2                       | 3,6                     |                      |
| 4        | 5,4                    | 2                      | 2                      | 2,2                    | 2                       | 2                       | 2                    |
| 5        | 7,3                    | 2                      | 2                      | 2                      | 2                       | 2                       |                      |
| 7        | 6,3                    | 6                      | 6                      | 7,6                    | 6,8                     | 4                       |                      |
| 8        | 9,3                    | 2                      | 2                      | 2                      | 2                       | 2                       |                      |
| 9        | 9,8                    | 6,3                    | 2,7                    | 4,4                    | 3,5                     | 6,5                     |                      |
| 10       | 3,8                    | 3                      | 2                      | 2                      | 2                       | 2                       | 2                    |
| 11       | 3,8                    | 2                      | 2                      | 2                      | 2                       | 2                       |                      |
| 12       | 27,5                   | 23,2                   | 3,3                    | 2                      | 4                       | 2                       |                      |
| 13       | 2,7                    | 2                      | 2                      | 2                      | 2                       | 2                       |                      |

(continuación)

| No.<br>Pac. | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 1 | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 2 | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 4 | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 6 | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 12 | IL-6 en<br>pg/ml<br>semana 18 | IL-6 en<br>pg/ml<br>mes 15 |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 14          | 2                            | 2                            | 2                            | 2                            | 2                             | 2                             | 2                          |
| 16          | 8,8                          | 2,8                          | 4,2                          | 2                            | 2                             | 2                             | 2                          |
| 17          | 9,7                          | 7,5                          | 4,5                          | 3,6                          | 2,7                           | 2                             |                            |
| 18          | 35,7                         | 4,6                          | 2,5                          | 3,2                          | 2,7                           | 2,7                           | 5,7                        |

## REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas, en el que dicho inhibidor
  - a. es un ligando a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  capaz de enlazarse selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$  con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor, y
  - b. es capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .
2. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula tipo anticuerpo, un constructo de receptor soluble, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos derivado de un receptor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  y una molécula de aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud.
3. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .
4. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de regeneración tardía de fracturas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano.
5. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho inhibidor es un constructo quimérico que une un dominio de enlace a antígeno que se enlaza selectivamente a IFN-gamma o TNF- $\alpha$ , a un dominio Fc de una inmunoglobulina humana.
6. El inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento o terapia de regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el inhibidor es etanercept (número CAS 185243-69-0).
7. Un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor es una molécula inhibidora de ARN o ADN direccionada a ARNm que codifica IFN-gamma o TNF- $\alpha$ .
8. Un inhibidor de las células CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas, en el que dicho inhibidor es capaz de enlazarse selectivamente a la superficie celular de una célula T CD8+ activada, y en el que dicho inhibidor además es capaz de anular o suprimir los efectos biológicos de una célula T CD8+ activada, particularmente capaz de inhibir la secreción de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  por dicha célula T CD8+.
9. El inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho inhibidor es un ligando a un miembro comprendido en el grupo marcador CD8 que comprende CD8, CD11 a/CD18, CD49d, CD137, y dicho inhibidor es capaz de enlazarse selectivamente a dicho miembro de dicho grupo marcador con una constante de disociación de  $10^{-8}$  mol/l o menor.
10. El inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo compuesto por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula tipo anticuerpo, un constructo de receptor soluble, un oligopéptido de 6 a 30 aminoácidos derivado de un receptor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  y una molécula de aptámero de ácido nucleico de 10 a 75 nucleótidos de longitud.
11. El inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal producido contra CD8, CD11a/CD18, CD49d o CD137.
12. El inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho inhibidor es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano.
13. El inhibidor de las células CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la terapia de la regeneración tardía de fracturas de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho inhibidor es alefacept.
14. Un inhibidor de las células T CD8+ activadas para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la regeneración tardía de fracturas, en el que el inhibidor es una molécula inhibitoria de ARN o ADN direccionada al ARNm que codifica CD8, CD11 a/CD18, CD49d o CD137.

15. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para tratar la regeneración tardía de fracturas, que comprende un inhibidor de IFN-gamma o TNF- $\alpha$  de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un inhibidor de células T CD8 activadas, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14.

Fig. 1

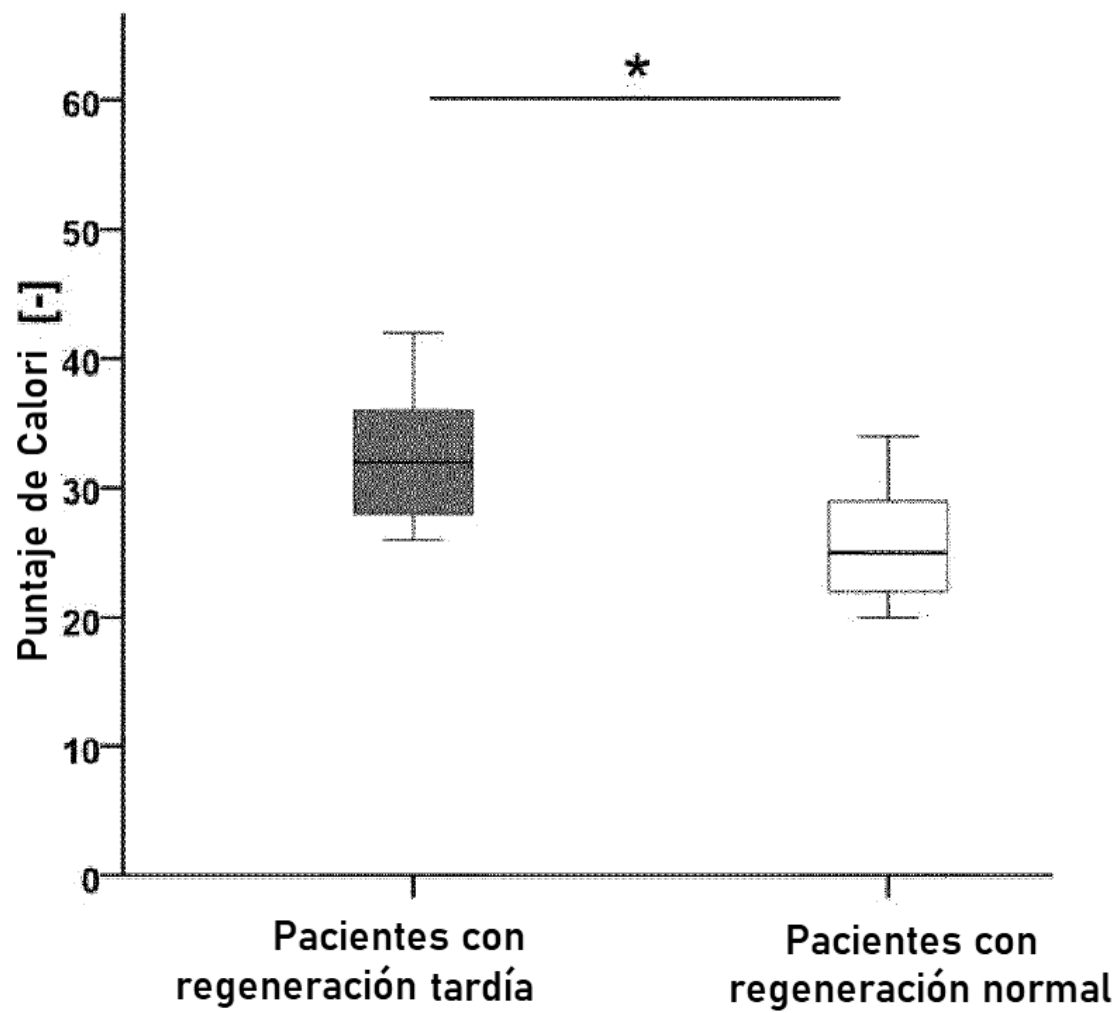


Fig. 2

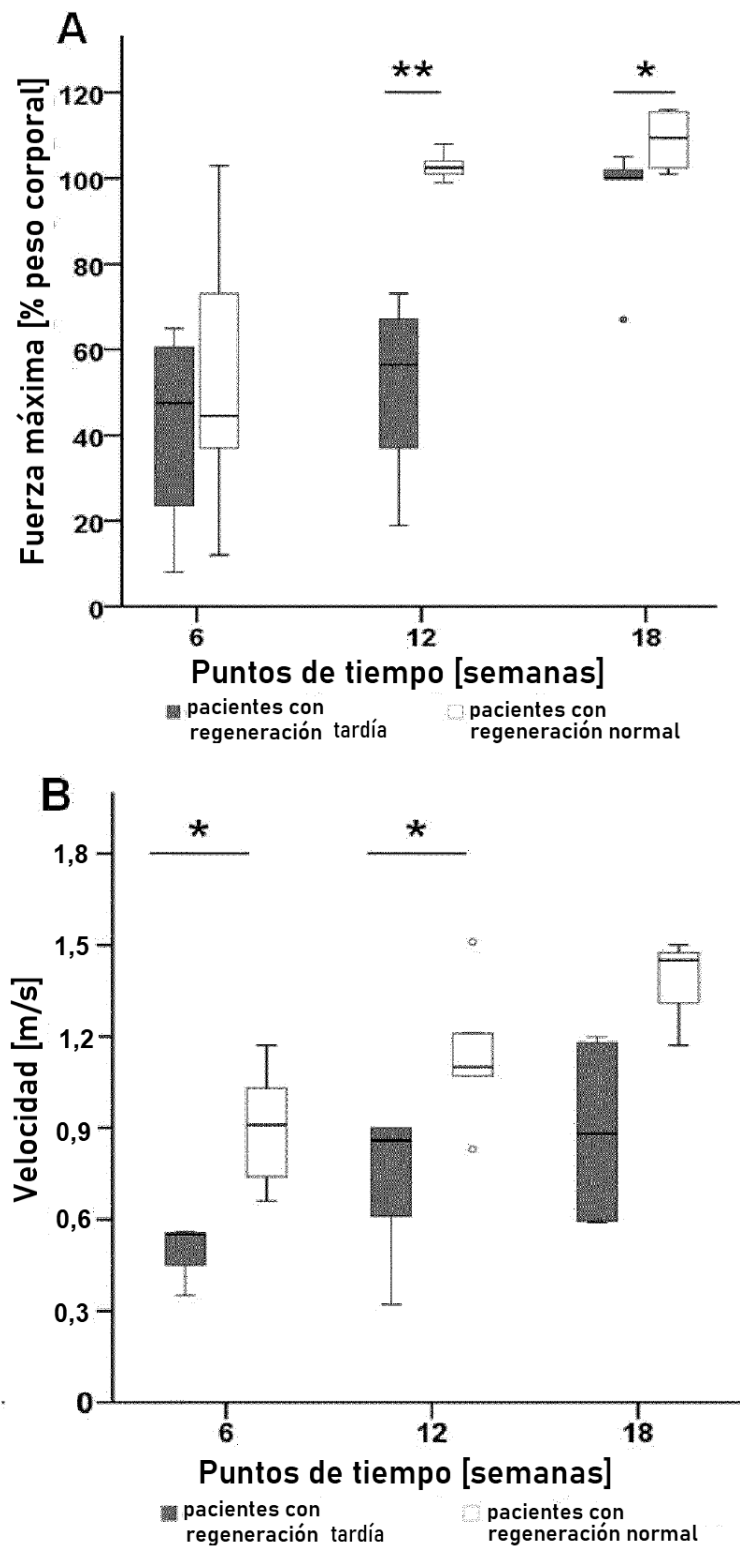


Fig. 3

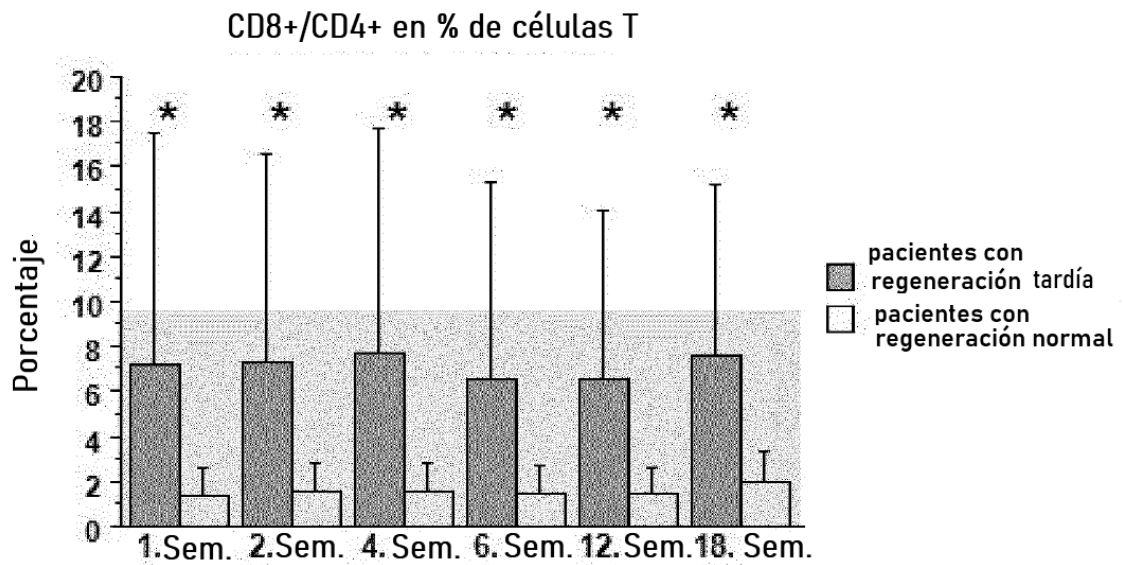
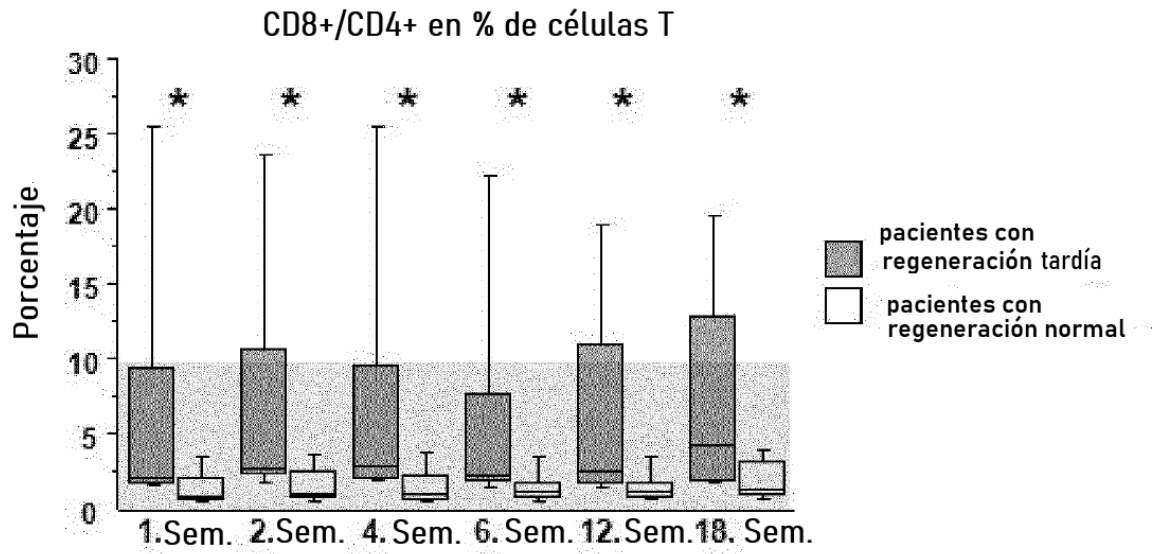




Fig. 4

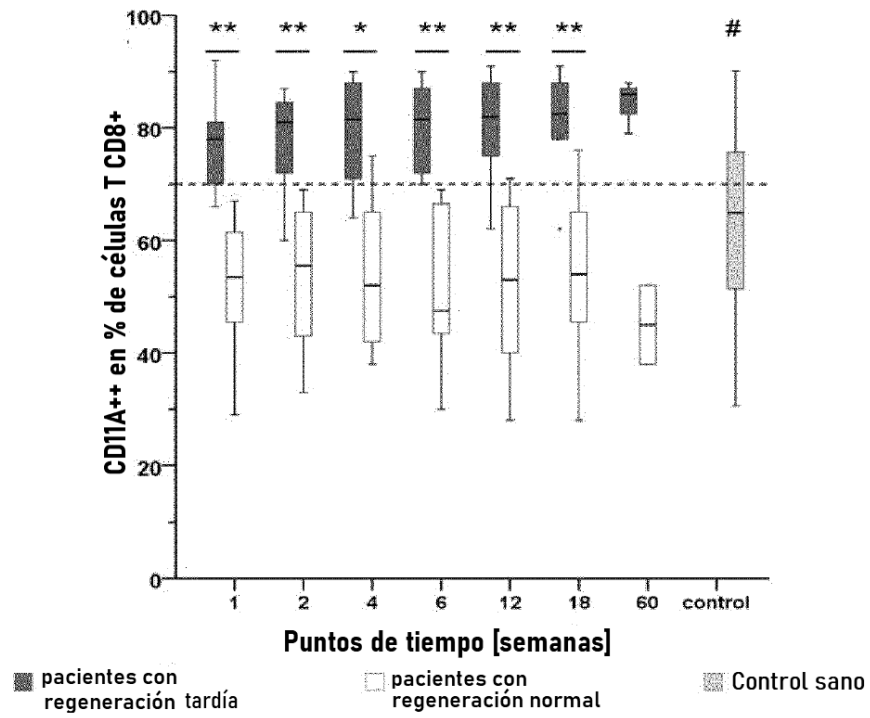


Fig. 5

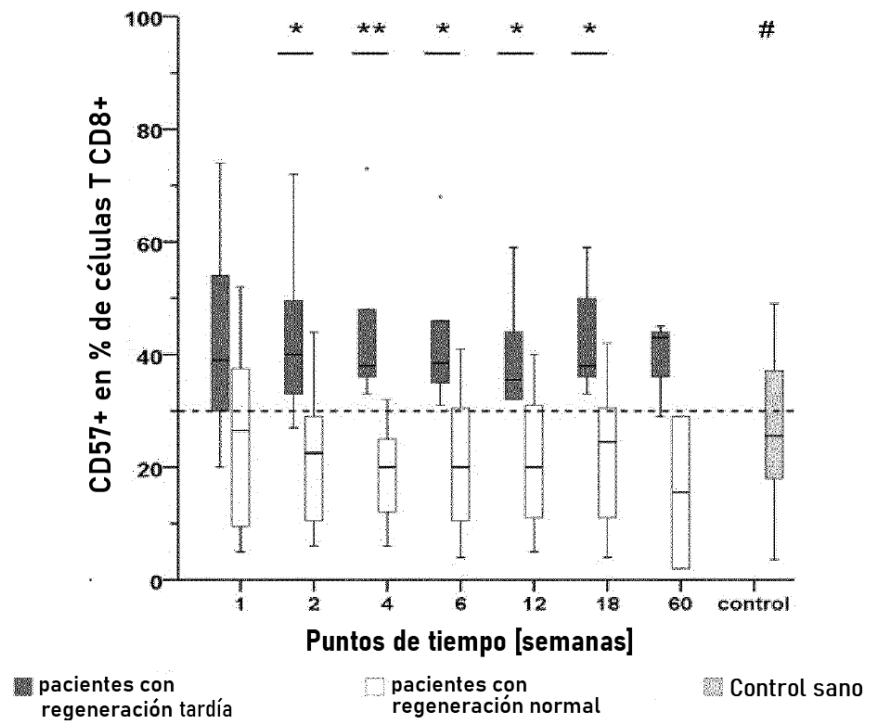


Fig. 6

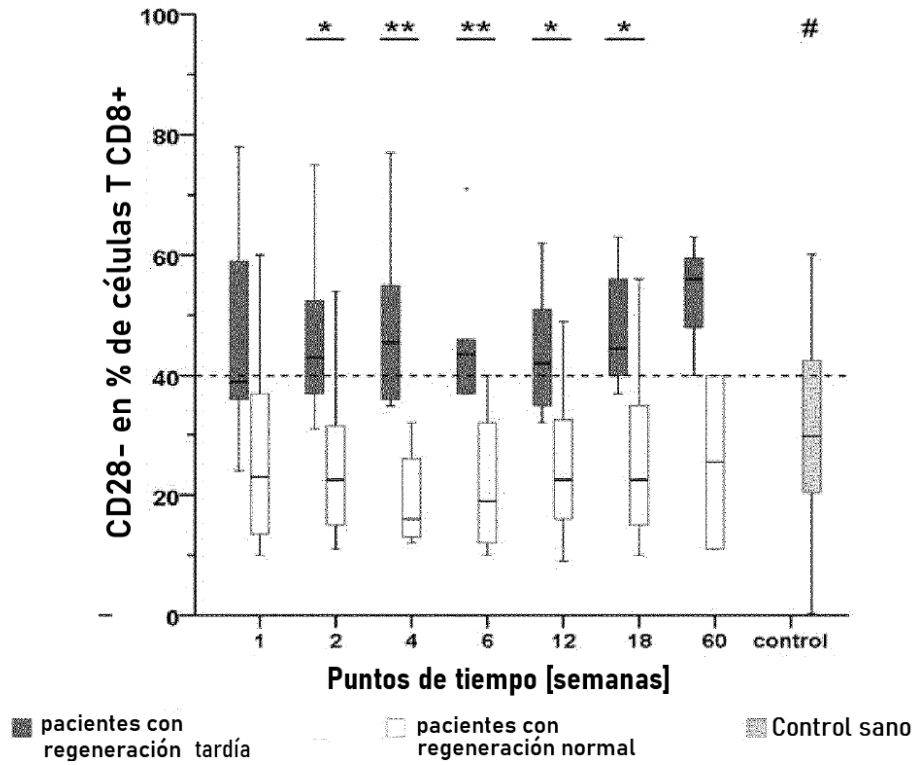


Fig. 7

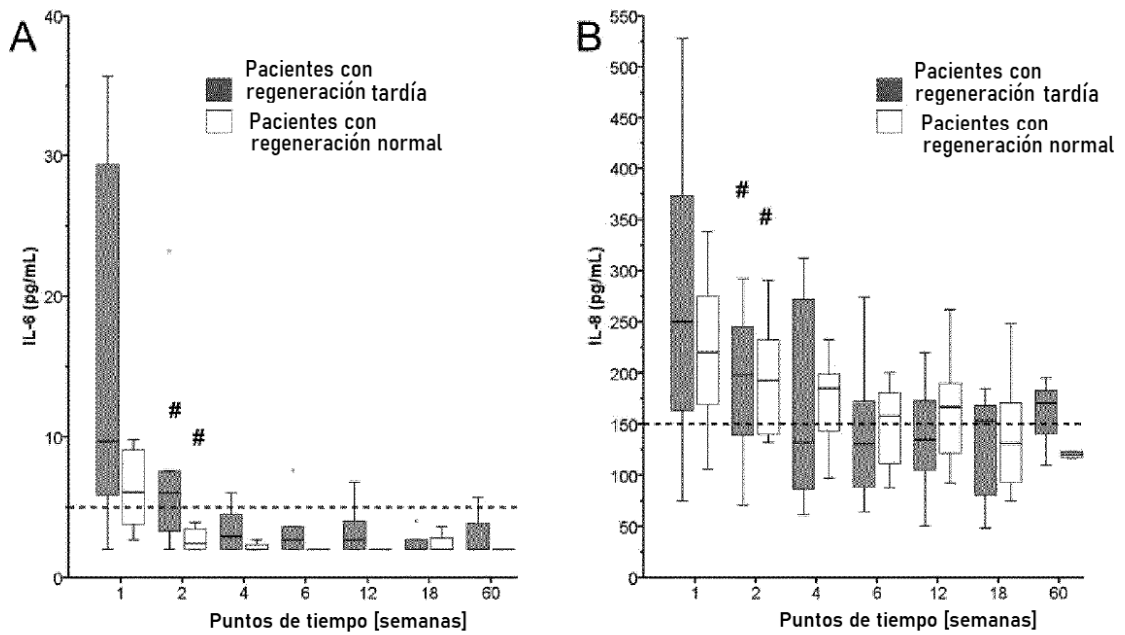


Fig. 8

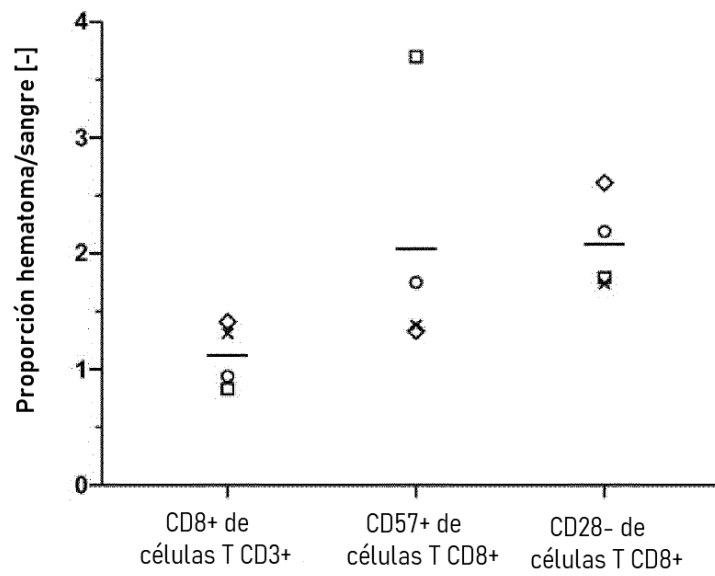


Fig. 9

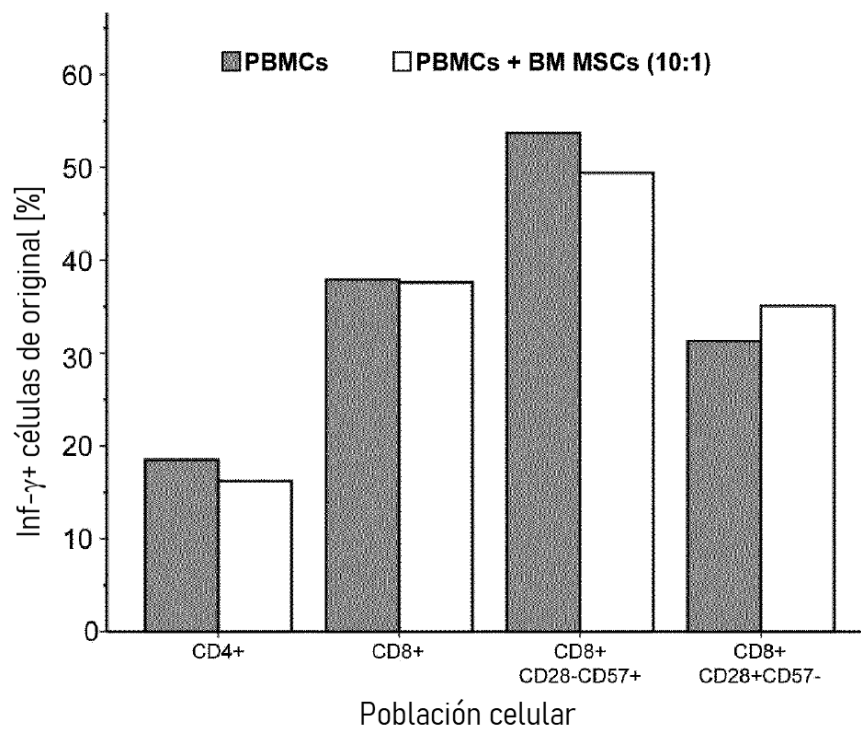


Fig. 10

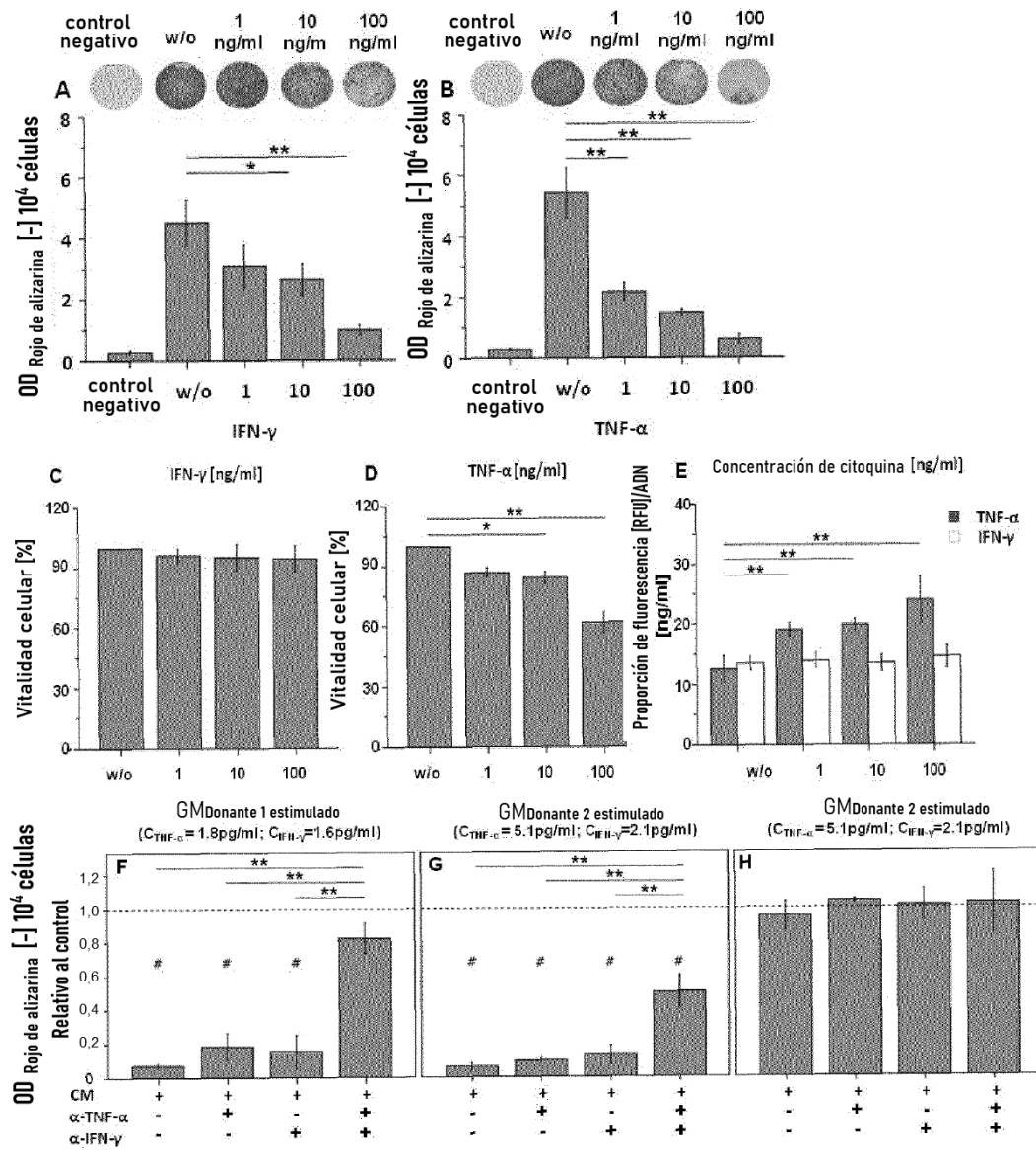


Fig. 11

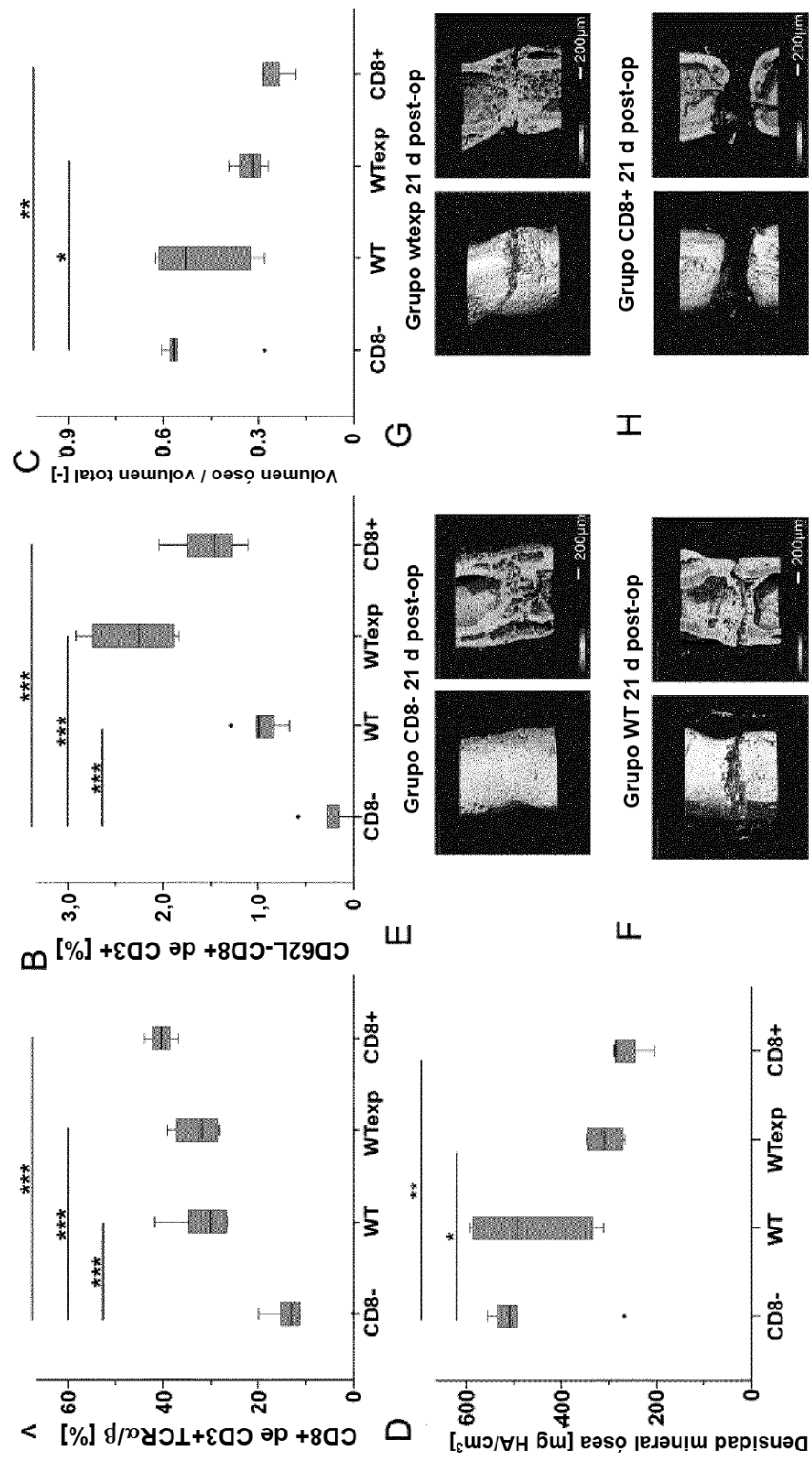


Fig. 12

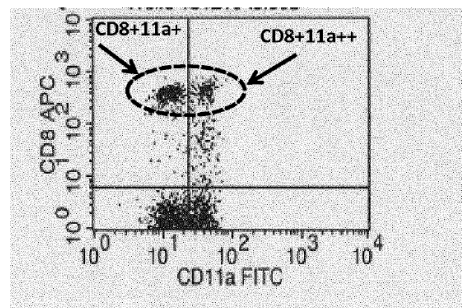
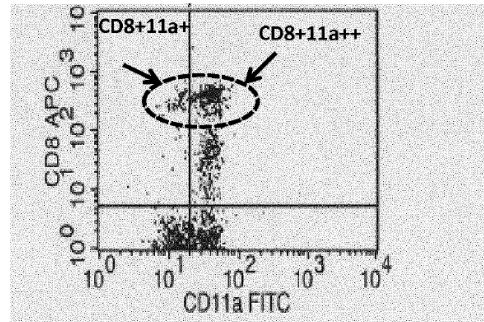


Fig. 13

CD45+ -> CD3+ -> CD8+ -> CD57+

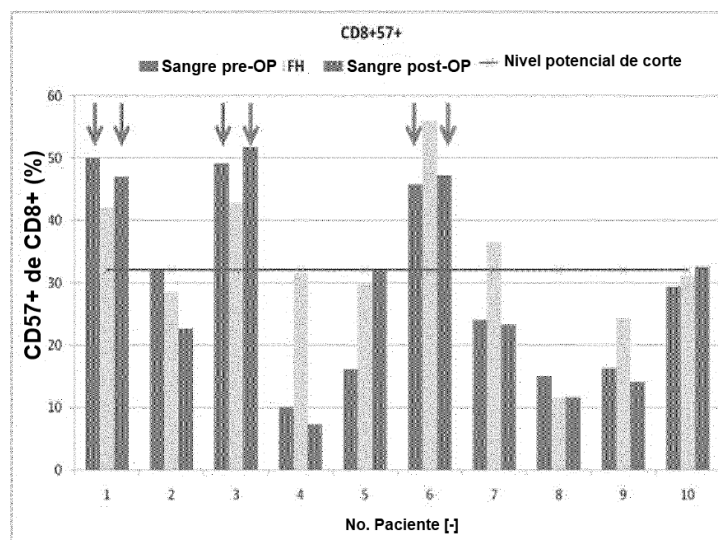


Fig. 14

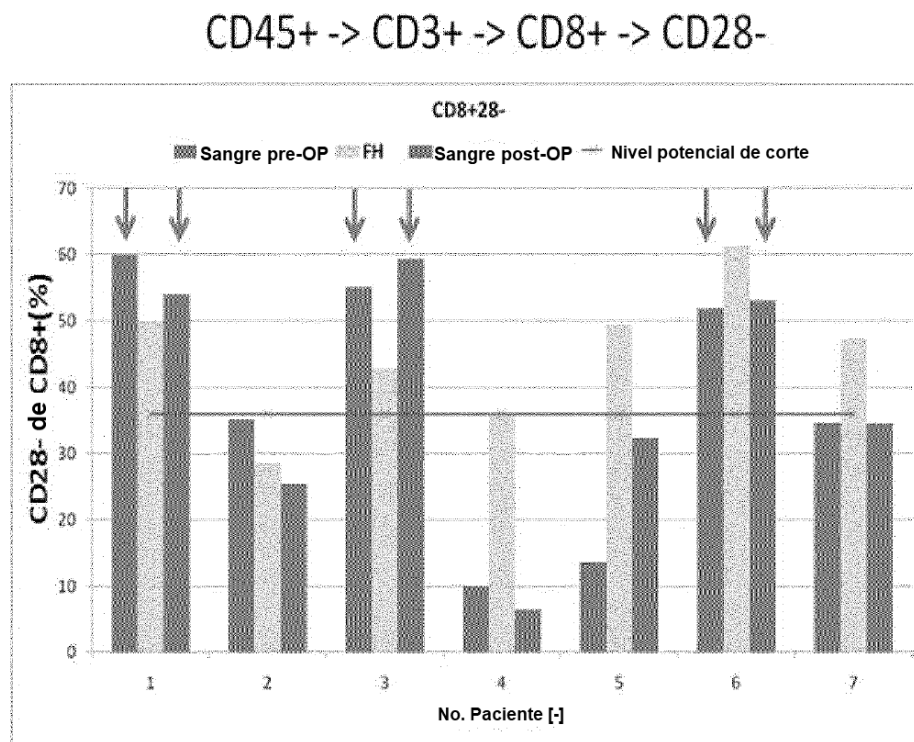


Fig. 15

