

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 384 790**

(21) Número de solicitud: 201031821

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

10.12.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2012

Fecha de la concesión:

07.05.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

20.05.2013

(73) Titular/es:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (33.3%)
SINESIO DELGADO, 6
28029 MADRID (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE GRANADA (33.3%) y
FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD (33.3%)**

(72) Inventor/es:

**GARCÍA CASTRO, Javier;
MARIÑAS PARDO, Luis Antonio;
RODRÍGUEZ MILLA, Miguel Ángel;
CUBILLO MORENO, Isabel María;
BLANCO MORÓN, Armando;
GARCÍA ALCALDE, Fernando;
MASIP ORDÓÑEZ, Manuel;
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, René y
RUBIO AMADOR, Ruth**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

(54) Título: **CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.**

(57) Resumen:

La presente invención se relaciona con células madre mesenquimales (CMM) aisladas a partir de la sangre periférica, caracterizadas porque expresan el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL 13RA2), así como con un método para aislar dichas CMM que comprende detectar la expresión de dicho IL13RA2 en células de una muestra de sangre periférica, y, si se desea, aislar dichas células que expresan IL13RA2.

ES 2 384 790 B1

DESCRIPCION

**CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS A PARTIR DE SANGRE
PERIFÉRICA**

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se relaciona con células madre mesenquimales (CMM) aisladas a partir de la sangre periférica, o de sus hemoderivados, caracterizadas porque expresan el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2), y con sus aplicaciones. La invención también se relaciona con un método para aislar dichas CMM basado en la detección del 10 marcador IL13RA2.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Un tipo de células madres adultas especialmente prometedor en aplicaciones terapéuticas es el formado por las denominadas células madre mesenquimales (CMM). 15

Las CMM son células madre pluripotentes progenitoras que han sido aisladas de médula ósea, tejido adiposo, cartílago, piel, músculo, hueso, sangre periférica y otros tejidos. Estas células tienen un potencial uso médico en la regeneración de tejidos ya que las CMM aisladas y expandidas en cultivo son capaces de diferenciarse a osteoblastos, 20 condroцитos, miocitos y adipocitos, entre otros tipos celulares, y pueden ser reintroducidas posteriormente en el cuerpo humano para reparar tejidos perdidos o dañados. Otra característica aún más valiosa en la práctica clínica es su capacidad de inmunomodulación, lo que les hace tremadamente útiles para enfermedades de base inmune.

25

La diferenciación de las CMM no es sólo un hecho descrito *in vitro*, sino que en diversos modelos animales de daño tisular se ha observado cómo, en la zona dañada, aparecían células no hematopoyéticas de la médula ósea o bien directamente CMM, y que estas células eran capaces de diferenciarse hacia el linaje celular del tejido donde 30 anidaban (piel, cerebro, hígado, etc) (Prockop DJ *et al.* 2003. Proc Natl Acad Sci USA., 100:11917-11923). Esto demuestra el potencial de las CMM para reparar y regenerar múltiples órganos gracias a su capacidad de movilizarse desde sus reservorios naturales hasta la sangre periférica, y de ahí extravasarse hacia el lugar donde se localiza el daño.

Esta movilización implica la presencia de CMM en sangre, al menos de forma transitoria. Efectivamente, diversos artículos han mostrado la posibilidad de aislar CMM de sangre periférica, de sangre de cordón umbilical e incluso de sangre fetal (Zvaifler NJ *et al.* 2000. *Arthritis Research*, 2:477-488; y He Q *et al.* 2007, *Stem Cells*; 5 25:69-77).

Una barrera para el estudio y la aplicación terapéutica de estas células es la dificultad de aislar CMM de sangre periférica con los métodos disponibles en la actualidad (Roufosse CA *et al.* 2004 *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 36:585-597). El cultivo 10 de CMM de sangre periférica también es poco reproducible, ya que sólo en un pequeño porcentaje de las muestras se consigue, por los métodos tradicionales, obtener y expandir durante meses poblaciones enriquecidas en CMM (Ramírez M *et al.* 2006. *British Journal Sports Medicine*, 40:719-22; García-Castro J *et al.* 2007, *Journal Pediatric Hematology Oncology*, 29:388-392).

15 En la actualidad el proceso de obtención y purificación de CMM de diversos tejidos sólidos se basa en el mismo principio, la adherencia innata de las CMM al plástico. En general, tras disgregar el tejido y obtener una muestra de células en suspensión se obtiene una fracción enriquecida en células mononucleares, utilizando gradientes de densidad, tales como ficoll o percoll. Esta fracción se suele depositar directamente sobre frascos de cultivo celular estándar con medios generalistas a los que se añade suero bovino fetal, y, al día siguiente, se retiran las células no adheridas y se mantiene el cultivo de células adheridas hasta que se enriquece en CMM (Friedenstein AJ *et al.* 20 1974 *Transplantation*, 17:331-340; WO 0183709; WO 0134775; WO 2005121317; WO 2005015151). Con esta metodología ocasionalmente se pueden obtener CMM de sangre periférica movilizada y con mucha menor probabilidad de sangre periférica no movilizada (Zvaifler NJ *et al.* 2000, *Arthritis Research*, 2: 477-488; He Q *et al.* 2007. *Stem Cells*, 25: 69-77; Lazarus HM *et al.* 1995. *Bone Marrow Transplantation*, 16: 557- 25 564; Wexler SA *et al.* 2003. *British Journal Haematology*, 121: 368-374; WO 0022097; 30 WO 9901145).

La solicitud de patente WO 2009/040458 describe un procedimiento de obtención de CMM con capacidad pluripotente que utiliza sangre periférica de mamíferos o sus

hemoderivados como fuente celular, y que consiste en la centrifugación en gradiente de densidad de dicha sangre periférica y posterior separación y lavado por centrifugación de la fracción celular mononuclear obtenida, resuspendiendo después las células sedimentadas y cultivándolas en unas condiciones determinadas.

5

Es conocido que las CMM sufren cambios fenotípicos y funcionales cuando dejan la médula ósea para dirigirse a la circulación periférica, lo que se traduce en un patrón de expresión génico distinto en CMM procedentes de médula ósea y en CMM procedentes de sangre periférica (Conrad C *et al.* 2008. *Stem Cells Dev*, 17:23-27).

10

Tondreau T y col. (Tondreau T *et al.* 2005. *Stem Cells*, 23:1105-1112) presentan tres métodos para el aislamiento de CMM de sangre periférica y de sangre procedente del cordón umbilical: dos de ellos se basan en la capacidad de dichas células de adherirse al plástico, y, el tercero, en la selección de células CD133⁺ que consiste en aislar dichas células mediante bolas magnéticas recubiertas de anticuerpo anti-CD133 a partir de la fracción mononuclear obtenida tras someter a gradiente de densidad las muestras de sangre periférica. Sin embargo, la fracción separada contiene tanto CMM como células madre hematopoyéticas, por lo que es necesario cultivar *in vitro* posteriormente las células aisladas.

15

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un método de aislamiento de CMM a partir de sangre periférica alternativo a los descritos en el estado de la técnica, que permita aislar CMM a partir de dicha fuente celular de una manera específica, fiable, sencilla y reproducible.

20

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en la identificación del receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2) en células madre mesenquimales (CMM) de sangre periférica, o de sus hemoderivados, y en el empleo de dicho IL13RA2 como marcador de dichas CMM.

Por tanto, la presente invención se relaciona con dichas CMM aisladas a partir de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que expresan IL13RA2, y con un método para aislar

dichas CMM basado en la detección de dicho IL13RA2. La invención también se relaciona con los usos y aplicaciones de dichas CMM aisladas procedentes de sangre periférica o de sus hemoderivados.

- 5 En un aspecto, la invención se relaciona con una célula madre mesenquimal, aislada, procedente de sangre periférica, o de sus hemoderivados, caracterizada porque expresa IL13RA2.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una población celular aislada que
10 comprende CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que expresan IL13RA2, proporcionadas por la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de CMM procedentes
de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en la que, al menos, el 50% de las CMM
15 procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que comprende dicha
composición, expresan IL13RA2. En una realización particular, dicha sangre periférica,
o sus hemoderivados, proceden de un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que
20 comprende al menos una de dichas CMM procedente de sangre periférica, o de sus
hemoderivados, proporcionada por la presente invención, o la población celular aislada
de CMM proporcionada por la presente invención, o la composición de CMM
procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, proporcionada por la presente
invención en la que, al menos, el 50% de las CMM procedentes de sangre periférica, o
25 de sus hemoderivados, que comprende dicha composición, expresan IL13RA2, y un
vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la identificación
y/o el aislamiento de CMM a partir de sangre periférica o de sus hemoderivados que
30 comprende detectar la expresión de IL13RA2 en células de una muestra de sangre
periférica o de sus hemoderivados y, si se desea, aislar dichas células que expresan
IL13RA2. Dicha CMM, aislada, obtenible según dicho método, así como sus
aplicaciones, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del IL13RA2 como marcador de una CMM procedente de sangre periférica, o de sus hemoderivados.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un reactivo con capacidad para detectar dicho IL13RA2 para la identificación y/o el aislamiento de CMM a partir de una muestra de sangre periférica, o de sus hemoderivados.

Finalmente, los usos de dicha CMM, población celular, composición de CMM o
10 composición farmacéutica proporcionadas por esta invención constituyen aspectos inventivos adicionales, por ejemplo, su uso en la preparación de un medicamento para inducir tolerancia al trasplante, o para tratar una enfermedad autoinmune, o para tratar una enfermedad inflamatoria, o para reparar y regenerar tejidos, o como vehículo celular de agentes terapéuticos.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Caracterización de CMM de sangre periférica conforme al panel de marcadores establecidos para las CMM en cultivo *in vitro*. **A)** Histogramas que muestran el análisis de los marcadores CD105, CD73, CD90, CD-19 y HLA-DR. **B)** Histogramas que muestran el análisis de los marcadores CD-106, CD-14 y CD-45.

Figura 2. Caracterización funcional de CMM de sangre periférica por su capacidad de diferenciación a adipocitos y osteocitos. **A)** Control diferenciación adipogénica; **B)** 25 Diferenciación adipogénica; **C)** Control diferenciación osteogénica; **D)** Diferenciación osteogénica.

Figura 3. Análisis por qRT-PCR de la expresión diferencial del ARNm de IL13RA2 en CMM de sangre periférica, en CMM de médula ósea y en CMM de tejido adiposo.

30

Figura 4. Análisis de la expresión de IL13RA2 en CMM obtenidas a partir de distintos tejidos: sangre periférica, médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en la identificación de IL13RA2 en CMM de sangre periférica, o de sus hemoderivados, y en el empleo de dicho IL13RA2 como marcador de dichas CMM. Efectivamente, los inventores han observado que las CMM de sangre periférica de un mamífero (humano) expresan IL13RA2, lo que permite utilizar a dicho IL13RA2 como marcador para identificar y/o aislar CMM a partir de la sangre periférica, o de sus hemoderivados, de un sujeto. Dichos inventores también han observado que, sorprendentemente, dicho marcador (IL13RA2) se encuentra sobreexpresado en CMM de sangre periférica con respecto a la expresión de dicho marcador en CMM de médula ósea y en CMM de tejido adiposo. Tal como se muestra en el Ejemplo 1, los inventores aislaron el ARN total de CMM procedentes de sangre periférica (SP-CMM), médula ósea (MO-CMM) y tejido adiposo (TA-CMM), y lo sometieron a ensayos de expresión génica mediante microarrays para identificar los genes diferencialmente expresados en cada una de dichas poblaciones celulares. Entre los genes expresados diferencialmente en SP-CMM respecto a las MO-CMM y TA-CMM se encuentra IL13RA2.

En base a este descubrimiento, se han desarrollado los aspectos inventivos que se explican en detalle a continuación.

CMM PROCEDENTES DE SANGRE PERIFÉRICA O DE SUS HEMODERIVADOS DE LA INVENCIÓN (SP-CMM)

En un aspecto, la invención se relaciona con una CMM aislada, procedente de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en adelante SP-CMM de la invención, caracterizada porque expresa IL13RA2.

En una realización particular, la SP-CMM de la invención expresa, además, uno o más marcadores de membrana plasmática seleccionados del grupo que consiste en CAMK2N1, CDH10, CLDN11, LSAMP, PSCA y SFRP1.

La expresión “célula madre”, “célula troncal” o *stem cell*, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a una célula totipotente, pluripotente o multipotente, capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas, y que además posee la capacidad de autoregenerarse, es decir, de producir más células madre. Las células madre totipotentes

- 5 pueden dar lugar a tanto los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares y dar lugar a un organismo completo. Las células madre pluripotentes pueden formar cualquier tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios
- 10 10 (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares pero a partir de ellas no se puede formar un organismo completo. Las células madre multipotentes son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje embrionario de origen.
- 15 Tal como se usa en la presente invención, el término “célula madre mesenquimal” (CMM) (en inglés, “*mesenchymal stem cell*” o “MSC”) se refiere a una célula madre mesenquimal pluripotente originalmente derivada de sangre periférica o de sus hemoderivados, que tiene la capacidad de autoregenerarse y de diferenciarse para producir células descendientes con una amplia variedad fenotípica, incluyendo tejidos
- 20 20 conectivos, estroma de médula ósea, adipocitos, dermis y músculo, entre otros. En general, las CMM presentan un perfil de expresión de marcadores celulares caracterizado porque son negativas para los marcadores CD19, CD45, CD14 y HLA-DR , y son positivas para los marcadores CD105, CD106, CD90 y CD73.
- 25 Las SP-CMM de la invención proceden de la sangre periférica, o de un hemoderivado de un sujeto. Tal como aquí se utiliza, el término “sujeto” incluye a cualquier animal que presente circulación sanguínea, preferiblemente, un mamífero, más preferiblemente, un primate, y todavía más preferiblemente, un ser humano, y pueden ser células de origen autólogo, alogénico o xenogénico en función del sujeto al que vayan a
- 30 30 administrarse. En una realización particular, la SP-CMM de la invención es de origen humano.

En la presente invención se entiende por “sangre periférica” a la sangre que circula por el organismo de un sujeto. Asimismo, tal como se utiliza en la presente descripción, la expresión “hemoderivados de sangre periférica” incluye a todos aquellos derivados de la sangre periférica pero que no presentan todos sus componentes, por ejemplo, un producto resultante de un proceso de aféresis, la capa leuco-plaquetaria (*buffy coat*), los concentrados plaquetarios, etc.

Como sabe el experto en la materia, las células progenitoras de la sangre periférica (entre las que se encuentran las SP-CMM) se encuentran en bajas concentraciones en la sangre periférica lo que dificulta su recolección. Sin embargo, esta situación puede solventarse mediante el uso de factores estimuladores, entre ellos el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), que ocasiona la liberación de las células madre desde su entorno natural en los nichos de la médula ósea y su movilización hacia la sangre (lo que se denomina sangre periférica movilizada). Por tanto, en una realización particular, la muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados procede de un sujeto al que se le ha administrado un factor estimulador, como por ejemplo G-CSF, el factor de crecimiento de colonias granulomacrocíticas (GM-CSF), un antagonista del receptor CXCR4, por ejemplo, el antagonista del receptor CXCR4 denominado AMD3100, o una catecolamina.

20

Tal y como se usa en la presente invención, el término “receptor alfa-2 de interleuquina 13” o “IL13RA2” (de aquí en adelante, “marcador de la invención”) hace referencia a la proteína de membrana que actúa como un receptor inactivo, ya que una vez unida la interleuquina 13 (IL13) a dicho receptor, éste es incapaz de transducir la señal. En el contexto de la presente invención, este término incluye todas las variantes del IL13RA2 es decir, aquellas proteínas presentes en distintas especies que aunque presentan distinta secuencia de aminoácidos desempeñan la misma función. Por ejemplo, en una realización particular de la invención, la SP-CMM de la invención procede de sangre periférica humana, o de sus hemoderivados; así, en una realización particular, dicho IL13RA2 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 que corresponde a IL13RA2 humano (GenBank, nº acceso AAH33705.1).

Variantes contempladas en el contexto de la presente invención incluyen proteínas que muestran al menos 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, ó 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1. El grado de identidad entre dos proteínas o péptidos se 5 puede determinar por métodos convencionales, por ejemplo, usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J., 1990, Mol. Biol. 10 215:403-410).

Las SP-CMM de la invención son capaces de expandirse *ex vivo*, es decir, tras aislarse, dichas células pueden mantenerse y dejar que proliferen en un medio de cultivo. En una realización particular, dicho medio de cultivo comprende medio de Eagle modificado 15 por Dulbecco (DMEM), antibióticos y L-glutamina, complementado con suero bovino fetal (FBS). Depende de la pericia del experto en la materia el modificar o modular las concentraciones de los medios y/o los complementos de medios según se requiera para las células usadas. Los sueros a menudo contienen factores y componentes celulares que son necesarios para la viabilidad y la expansión celular. Ejemplos ilustrativos, no 20 limitativos, de sueros incluyen el FBS, el suero bovino (BS), el suero de ternero (CS), el suero de carnero fetal (FCS), el suero de carnero neonato (NCS), el suero de cabra (GS), el suero de caballo (HS), el suero porcino, el suero de ovejas, el suero de conejo, el suero de rata (RS), etc. También se contempla, si las células de la invención son de origen humano, complementar el medio de cultivo celular con un suero humano, 25 preferentemente de origen autólogo. Se entiende que los sueros pueden inactivarse por calor a 55-65°C, si se considera necesario, para inactivar los componentes de la cascada del complemento. Puede usarse también la modulación de las concentraciones de suero, la retirada de suero del medio de cultivo para promover la supervivencia de uno o más tipos de célula deseados. Las SP-CMM de la invención pueden expandirse en un medio 30 de cultivo de composición definida, en el que se reemplaza el suero por una combinación de albúmina de suero, transferrina de suero, selenio y proteínas recombinantes incluyendo, aunque sin limitarse a ello, insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF).

Muchos medios de cultivo celular ya contienen aminoácidos; no obstante, algunos requieren ser complementados antes de cultivar las células. Dichos aminoácidos incluyen, aunque sin limitarse a ello, L-alanina, L- arginina, ácido L-aspártico, L-5 cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-glicina y otros similares. Normalmente también se usan agentes antimicrobianos en el cultivo de células para mitigar la contaminación microbiana. Habitualmente, los compuestos antibióticos o antimicóticos usados incluyen mezclas de penicilina y estreptomicina, que pueden incluir también, aunque sin limitarse a ello, anfotericina, ampicilina, gentamicina, 10 bleomicina, higromicina, kanamicina, mitomicina, etc. Las hormonas pueden usarse también en el cultivo celular e incluyen, aunque sin limitarse a ello, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, b-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, somatostatina/hormona del crecimiento humano (HGH), etc.

15 Las condiciones de mantenimiento de las SP-CMM de la invención pueden incluir también el empleo de factores celulares que permiten que las células permanezcan en una forma no diferenciada. Posteriormente, como entiende el experto en la materia, cuando se quiere que las células se diferencien deben eliminarse del medio de cultivo los complementos que inhiben la diferenciación celular.

20

Si se desea, las SP-CMM de la invención pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o los pocillos de una placa “multi-pocillo”). Otra opción es que las células pueden 25 subclonarse en una placa “multi-pocillo” en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 a cerca de una célula/pocillo o incluso de unas 0,25 a 0,5 células/pocillo, como por ejemplo 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y 30 aislarlas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado cuando su fenotipo de desarrollo pueda evaluarse.

Preferiblemente, el cultivo de las SP-CMM de la invención se realiza sobre una matriz extracelular, de forma que las células pueden adherirse a ella con facilidad y se favorezca el crecimiento de las mismas. Dicha matriz extracelular estará compuesta, 5 preferiblemente, de ligandos receptores con el motivo de unión RGD (arginina-glicina-aspártico); no obstante, otros ligandos receptores con otros motivos de unión diferentes también pueden ser utilizados.

Si se desea, la SP-CMM de la invención puede ser modificada genéticamente por 10 cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, delecciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por ejemplo, proteínas con propiedades 15 terapéuticas. En la Tabla 1 se recogen, a modo ilustrativo, no limitativo, ejemplos de proteínas terapéuticas que pueden ser producidas por las SP-CMM de la invención y la enfermedad que puede ser tratada con ellas.

Tabla 1**Proteínas terapéuticas y enfermedades para las que se pueden utilizar**

Proteína terapéutica	Enfermedad
GHRH	Retrasos del crecimiento
GnRH	Cáncer de próstata, infertilidad
TRH	Colestacia, hipotiroidismo
Somatostatina	Tratamiento de hemorragias digestivas por ruptura de varices esofágicas
GH	Deficiencia de GH, síndrome de Turner, fallo renal crónico, retardo del crecimiento intrauterino
LH	Infertilidad
FSH	Infertilidad
Prolactina	Deficiencia de prolactina
Oxitocina	Estimulación uterina en parto asistido
ADH	Diabetes insípidus, enfermedad de von Willebrand
Melatonina	Alteraciones de los ritmos circadianos del sueño, migrañas
Factor inhibidor Mülleriano	Endometriosis, adenomiosis, cáncer de útero
Calcitonina	Osteoporosis, hipercalcemia
Secretina	Autismo
IGF-I	Retraso del crecimiento, diabetes tipo I y II, esclerosis lateral amiotrófica
PNA	Hipertensión
Insulina	Diabetes
Glucagón	Hipoglucemias
Hormona paratiroides	Osteoporosis
Factores de coagulación	Hemofilia
IL-1	Estimulación de la hematopoyesis
Interferones	Cáncer
G-CSF	Cáncer
BMPs	Neutropenia
TGF-beta	Espina bífida
Ciclosporina	Cáncer
Hirudina	Enfermedades autoinmunes, rechazos de transplantes
Imiglucerasa	Trombosis
Activador de plasminógeno tipo tisular (tPA)	Enfermedad de Gaucher
Antitripsina 1 alfa	Deficiencia congénita de antitripsina 1 alfa
Lactoferrina	Infecciones
Inmunoglobulinas	Enfermedades infecciosas
Superoxide dismutasa	Esclerosis lateral amiotrófica
NGF, GDNF, BDNF, IGF	Enfermedades neurodegenerativas
VEGF, FGF, angiopoyetinas	Angiogénesis
Endostatina, mAb VEGF	Anti-angiogénesis
Anticuerpos monoclonales	Inmunoterapia

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una población celular aislada, en adelante, “población celular de la invención”, que comprende células madre mesenquimales procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que expresan IL13RA2, es decir, SP-CMM de la invención. La población celular de la invención puede conservarse a largo plazo en un medio apropiado, compatible con las SP-CMM

de la invención, por ejemplo, soluciones isotónicas, opcionalmente suplementadas con suero; medios de cultivo celular o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como se menciona más adelante. Adicionalmente, si se desea, dicho medio puede contener un agente de crioconservación, por ejemplo,

- 5 dimetilsulfóxido (DMSO). La población celular de la invención puede ser mantenida congelada bajo condiciones que no afecten ni comprometan su viabilidad después de su reconstitución; asimismo, si se desea, la población celular de la invención puede encontrarse en un banco de células para trasplante.

- 10 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en adelante “composición de CMM de la invención”, en la que, al menos, el 50% de las CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que comprende dicha composición expresan IL13RA2, es decir, son SP-CMM de la invención.

15

En una realización particular, dicha composición de CMM de la invención es una composición de CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en la que, al menos, el 60%, preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 80%, aún más preferiblemente, el 90%, y, todavía aún más preferiblemente, el 95% de las CMM

- 20 procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que comprende dicha composición expresan IL13RA2, es decir, son SP-CMM de la invención.

- Dicha composición de CMM de la invención puede contener un medio en el que se encuentran las células de dicha CMM de la invención; dicho medio debe ser compatible con dichas células, en particular con las SP-CMM de la invención presentes en dicha composición de CMM de la invención, por ejemplo, soluciones isotónicas, opcionalmente suplementadas con suero; medios de cultivo celular o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como se menciona más adelante.

30

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCIÓN

Las SP-CMM de la invención, la población celular de la invención, así como la composición de CMM de la invención, pueden formar parte de una composición farmacéutica para su administración a un sujeto.

- 5 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, de aquí en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende una SP-CMM de la invención, una población celular de la invención, o una composición de CMM de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 El término “vehículo aceptable farmacéuticamente” se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal, o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.
- 15 El término “vehículo”, tal como aquí se utiliza, incluye diluyentes, coadyuvantes, excipientes o portadores con los que se deben administrar las SP-CMM o la composición de CMM de la invención. Obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichas CMM. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicho vehículo incluyen
- 20 cualquier vehículo fisiológicamente compatible, por ejemplo, soluciones isotónicas (e.g., solución salina estéril al 0,9% NaCl, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), solución Ringer-lactato, etc.), opcionalmente suplementadas con suero, preferiblemente con suero autólogo; medios de cultivo celular (e.g., DMEM, etc.); o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso, tal como
- 25 colágeno, colágeno-glicosamino-glicano, fibrina, cloruro de polivinilo, poliaminoácidos, tales como polilisina, poliornitina, etc., hidrogeles, agarosa, sulfato de dextrano silicona. Asimismo, si se desea, el medio de soporte puede, en realizaciones específicas, contener factores de crecimiento u otros agentes. Si el soporte es sólido, semisólido, o gelatinoso, las CMM proporcionadas por esta invención (SP-CMM de la
- 30 invención y composición de CMM de la invención) pueden ser introducidas en una fase líquida del vehículo que es tratada posteriormente de forma tal que se convierte en una fase más sólida.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado de las CMM proporcionadas por la invención, los cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias

- 5 farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes, conservantes, etc. También, para estabilizar la suspensión celular, es posible añadir quelantes de metales. La estabilidad de las CMM proporcionadas por la invención en el medio líquido de la composición farmacéutica de la invención puede mejorarse mediante la adición de sustancias adicionales, tales como, por ejemplo, ácido
10 aspártico, ácido glutámico, etc. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, por los técnicos en la materia y se usan normalmente en la elaboración de composiciones celulares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. Puede
15 encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

La composición farmacéutica de la invención contendrá una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de las SP-CMM de la invención o de la composición de

- 20 CMM de la invención, preferentemente, una población celular sustancialmente homogénea, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Tal como se usa en la presente descripción, el término "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad de CMM proporcionadas por la invención (SP-CMM de la invención o composición de CMM de la invención) contenida en la composición
25 farmacéutica de la invención que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado y, en general, se determinará, entre otros factores, por las propias características de dichas CMM y el efecto terapéutico deseado que se persigue. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de dichas CMM proporcionadas por la invención que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las propias características del sujeto, la
30 gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para el experto en la materia, el cual debe ajustar esa dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos. A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la composición farmacéutica de

la invención puede administrarse como una dosis única, que contenga entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 10×10^6 SP-CMM de la invención por kilogramo (kg) de peso corporal del receptor, preferentemente entre aproximadamente 5×10^5 y aproximadamente 5×10^6 SP-CMM de la invención por kg de peso corporal del receptor, más preferentemente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 2×10^6 SP-CMM de la invención por kg del peso corporal del receptor, dependiendo de los factores descritos anteriormente. La dosis de SP-CMM de la invención puede repetirse, dependiendo del estado y evolución del sujeto, en intervalos temporales de días, semanas o meses que debe establecer el especialista en cada caso.

10

La composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La composición farmacéutica de la invención puede prepararse en un modo de dosificación líquido o gel, por ejemplo, en forma de suspensión, para ser inyectada o perfundida a un sujeto. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen la

15

formulación de la composición farmacéutica de la invención en una suspensión estéril con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución isotónica, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfatos (PBS), o cualquier otro vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado, para la administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, etc., aunque también son posibles otras rutas alternativas de administración.

20

La administración de la composición farmacéutica de la invención al sujeto se llevará a cabo por medios convencionales. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar a dicho sujeto por vía intravenosa utilizando los dispositivos

25

adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocares, cánulas, etc. El flujo de las células se puede controlar por inflado y desinflado en serie de globos distales y proximales ubicados dentro de la vasculatura del sujeto, creando así zonas temporales sin flujo que promueven la acción terapéutica celular. En todos los casos, la

30 composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (e.g.,

- 5 por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.
- 10 La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede almacenar junto a medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas), la composición farmacéutica de la invención puede almacenarse a temperatura ambiente o por debajo de ésta en un recipiente sellado complementándola o no con una solución nutritiva. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferentemente a 2-8°C, y la composición farmacéutica de la invención incluirá una solución iso-osmótica y tamponada en un contenedor
- 15 compuesta de, o revestida de, material que previene la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se lleva a cabo preferentemente por medio de crioconservación adecuada y almacenamiento en condiciones que promueven la retención de la función celular.
- 20
- 25 La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse en una terapia combinada como se ha descrito previamente de utilidad en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad que vaya a ser tratada. Dichos compuestos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o se pueden suministrar, de forma alternativa, en forma de una composición aparte para la administración simultánea o sucesiva
- 30 (secuencial en el tiempo) con respecto a la administración de la composición farmacéutica de la invención. Otra opción consiste en mezclar cualesquiera de dichos compuestos adicionales en una misma composición y administrarlos conjuntamente.

MÉTODO DE LA INVENCIÓN

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la identificación y/o el aislamiento de una célula madre mesenquimal a partir de sangre periférica o de sus hemoderivados (SP-CMM de la invención), en adelante “método de la invención”, que comprende detectar la expresión de IL13RA2 en células de una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y, si se desea, aislar dichas células que expresan IL13RA2.
- 10 En la presente invención, se entiende por “identificación” al proceso que permite reconocer a una CMM presente en una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y distinguirla del resto de células presentes en dicha muestra. Asimismo, el término “aislamiento” de una CMM se refiere a la separación de dicha célula del resto de componentes que existen en una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados.
- 15

La expresión “aislada”, tal como aquí se utiliza, aplicada a una SP-CMM de la invención significa que dicha CMM está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en la sangre periférica, o en un hemoderivado de la misma, de un sujeto del que se haya extraído la sangre periférica para el aislamiento de dichas CMM. En general, una CMM procedente de sangre periférica, o de un hemoderivado de la misma, está esencialmente libre de otras células presentes normalmente en dicha sangre periférica o hemoderivado de la misma cuando se separa de, al menos, el 80%, preferentemente de, al menos, el 90%, más preferentemente de, al menos, el 95%, aún más preferentemente de, al menos, el 96%, 97%, 98% o incluso 99%, de otras células presentes normalmente en dicha sangre periférica o hemoderivado de la misma.

Los términos “célula madre”, “célula madre mesenquimal” o “CMM”, “sangre periférica” y “hemoderivados de sangre periférica” han sido definidos y explicados previamente en la descripción y son aplicables al método de la invención.

La sangre periférica, o sus hemoderivados, para el aislamiento e identificación de las SP-CMM de la invención procede de un sujeto. Tal como aquí se utiliza, el término

“sujeto” incluye a cualquier animal, en particular, animales vertebrados, preferentemente mamíferos, tales como ratones, ratas, caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc. En una realización particular, la sangre periférica o sus hemoderivados es de origen humano.

5

- En una realización particular, la muestra de sangre periférica utilizada se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada y sin movilizar obtenida por técnicas de aféresis fresca o criopreservada, fracción CD34- fresca o criopreservada obtenida de sangre periférica movilizada, “*buffy coats*” (fracción de una muestra de sangre anticoagulada, después de una centrifugación en gradiente de densidad, que contiene la mayoría de los leucocitos y plaquetas) y combinaciones de las mismas.
- 15 Una vez que se ha obtenido la muestra de sangre periférica, ésta debe tratarse para aislar las células mononucleares. Cualquiera de los métodos existentes en el estado de técnica para aislar células mononucleares de sangre periférica o de sus hemoderivados puede emplearse en la puesta en práctica de la presente invención, por ejemplo, mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Science), Percoll, sacarosa, etc.

20

- Como se ha comentado previamente, las células progenitoras de la sangre periférica (entre las que se encuentran las SP-CMM de la invención) suelen encontrarse en bajas concentraciones lo que dificulta su recolección. Para solventar esta situación, pueden administrarse al sujeto factores estimuladores que movilizan las CMM desde la médula ósea o tejido adiposo a la sangre periférica. Por tanto, en una realización particular, la muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados procede de un sujeto al que se le ha administrado un factor estimulador, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, AMD3100, etc.

- 25 Una vez aisladas las células mononucleares, se procede a detectar la expresión de IL13RA2 que actúa como marcador de las SP-CMM de la invención, presentes en sangre periférica o en sus hemoderivados, siendo posible la identificación de dichas células y su posterior aislamiento.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de IL13RA2 como marcador de CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en particular, de las SP-CMM de la invención. Por tanto, dicho IL13RA2 puede ser utilizado para la identificación y/o el aislamiento *in vitro* de SP-CMM de la invención a 5 partir de sangre periférica o sus hemoderivados.

El término “receptor alfa-2 de interleuquina 13” o “IL13RA2” (“marcador de la invención”) ha sido definido previamente.

- 10 En la presente invención se entiende por “marcador” a una proteína que distingue una célula (o grupo de células) de otra célula (o grupo de células). Por ejemplo, una proteína que se expresa en la superficie de células precursoras pero no en otras células de una población celular actúa como proteína marcadora para las células precursoras. Habitualmente, el marcador es un antígeno celular de superficie, de manera que pueden 15 utilizarse anticuerpos que se enlazan con la proteína marcadora en métodos de selección celular, por ejemplo, para producir una población celular rica en células que expresan la proteína marcadora. Adicionalmente, la SP-CMM de la invención puede contener otros marcadores celulares característicos de dichas SP-CMM de la invención. En una realización particular, la SP-CMM de la invención expresa, además, uno o más 20 marcadores de membrana plasmática seleccionados del grupo que consiste en CAMK2N1, CDH10, CLDN11, LSAMP, PSCA y SFRP1.

La detección del marcador de la invención y el posterior aislamiento de las células que expresen dicho marcador, es decir, el aislamiento de las SP-CMM de la invención, 25 puede realizarse mediante cualquier método que permita la separación de células en función de una característica fenotípica dada.

En los ensayos de identificación y/o aislamiento, la población celular se pone en contacto con un reactivo específico, marcado o no, en función de si el ensayo se realiza 30 mediante un método de detección directa o indirecta, respectivamente.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un reactivo capaz de detectar la expresión de IL13RA2 para la identificación y/o el aislamiento de SP-CMM de la invención.

- 5 El término “reactivo específico” hace referencia a un miembro de una pareja específica de unión. Como miembros de una pareja específica de unión se incluyen además de parejas de unión compuestas por antígenos y anticuerpos, parejas compuestas por antígenos MHC y receptores de células T, secuencias nucleotídicas complementarias, así como parejas de ligandos peptídicos y su receptor. Las parejas de unión específicas
10 incluyen análogos, fragmentos y derivados de un miembro específico de la pareja de unión.

Resulta de particular interés, el uso de anticuerpos como reactivos de afinidad. La producción de anticuerpos monoclonales específicos resultará evidente para cualquier
15 experto medio en la materia. En experimentos de identificación o separación de poblaciones celulares, se procede al marcaje de los anticuerpos. Para ello, se utilizan etiquetas que incluyen pero no se limitan a: partículas magnéticas, biotina y fluorocromos que permitirán la identificación o separación de aquel tipo celular al que se haya unido el anticuerpo. Así, por ejemplo, el análisis de la población celular
20 mediante citometría de flujo permite utilizar en una misma muestra distintos anticuerpos marcados con fluorocromos que emiten a una longitud de onda distinta. De este modo, se puede conocer el perfil específico de la población celular para esos marcadores de superficie, así como llevar a cabo una separación por el conjunto de marcadores utilizados.

25 La separación de las poblaciones que presentan el fenotipo de interés se puede llevar a cabo mediante técnicas de separación por afinidad, entre las que se incluyen: separación magnética (utilizando partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos), cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a anticuerpos monoclonales o
30 usados junto a anticuerpos monoclonales, y “panning” con el anticuerpo asociado a un soporte sólido, así como mediante otras técnicas que resulten adecuadas. Se puede obtener una separación más precisa mediante citometría de flujo, técnica que permite

separar poblaciones celulares en función de la intensidad de la tinción, junto con otros parámetros como el tamaño celular y la complejidad celular.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las 5 características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz láser. En el análisis por citometría de flujo, se coloca a las células en presencia un compuesto que se une específicamente a dicho marcador, como por ejemplo, un anticuerpo, y en función del compuesto las células son clasificadas. Si el compuesto está marcado con fluorescencia, hablamos estrictamente 10 de citofluorímetros de flujo, los conocidos como “citómetros” o “FACS” (por “Fluorescence Analyzer Cell Sorter”). Los citómetros de flujo pueden analizar partículas en función de su fluorescencia y tamaño. Los conocidos como separadores o “sorters” pueden también purificar poblaciones en función de unas características determinadas.

15

En citometría de flujo, para que un marcador se considere positivo, la señal específica observada debe ser más fuerte que la intensidad de la señal de fondo, típicamente debe ser al menos un 10%, preferiblemente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o incluso 100% superior a la intensidad de la señal de fondo, usando métodos y aparatos 20 convencionales. La señal de fondo se define como la intensidad de la señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar el marcador de superficie en análisis FACS convencionales.

Una vez que se ha puesto en práctica el método de la invención, se obtiene como 25 resultado una CMM aislada a partir de sangre periférica, o sus hemoderivados, que expresa IL13RA2 (es decir, SP-CMM de la invención).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una CMM aislada procedente de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que expresa IL13RA2 (SP-CMM de la 30 invención), obtenible mediante el método de la invención.

Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con una CMM aislada procedente de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que expresa IL13RA2 (SP-CMM de la

invención), obtenible mediante un método que comprende detectar IL13RA2 en la superficie de dicha CMM procedente de una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y aislar dicha CMM que expresa IL13RA2.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una población celular aislada que comprende dichas CMM que expresan IL13RA2 (SP-CMM de la invención), obtenibles mediante el método de la invención, o mediante un método que comprende detectar IL13RA2 en la superficie de dichas CMM procedentes de una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y aislar dichas CMM que expresan IL13RA2.

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en la que, al menos, el 50% de las CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que comprende dicha composición son CMM que expresan IL13RA2 (SP-CMM de la invención), obtenibles

- 15 mediante el método de la invención, o mediante un método que comprende detectar IL13RA2 en la superficie de dichas CMM procedentes de una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y aislar dichas CMM que expresan IL13RA2. En una realización particular, dicha composición de CMM es una composición de CMM procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en la que, al menos, el 60%,
20 preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 80%, aún más preferiblemente, el 90%, y, todavía aún más preferiblemente, el 95% de las CMM procedentes de sangre periférica o de sus hemoderivados, que comprende dicha composición expresan IL13RA2.

25 **USOS DE LAS CÉLULAS DE LA INVENCIÓN**

El uso de CMM en el tratamiento de enfermedades está siendo estudiado, entre otras razones, en base a sus propiedades antiinflamatorias *in vitro*, a su eficacia en modelos animales y a algunos resultados aislados conseguidos en ensayos clínicos en humanos.

- 30 Se están desarrollando ensayos clínicos en fase I/II para estudiar su uso en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y de la esclerosis múltiple y se planea comenzarlos en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, vasculitis sistémica, diabetes tipo 1 y otras muchas enfermedades de base inmune.

También es conocido del estado de la técnica la capacidad de las CMM de interactuar con células del sistema inmunológico para controlar una respuesta inmunológica, que en el caso de las enfermedades autoinmunes, es la responsable de la destrucción de los 5 diferentes tejidos o células específicas provocando su deterioro. En estos casos, el uso de CMM logra anergizar a los linfocitos T, B y NK logrando un estado asintomático libre de medicamentos inmunosupresores.

Por lo tanto, dentro del ámbito de la presente invención, se contempla el empleo de las 10 SP-CMM de la invención para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o de una enfermedad inflamatoria, en la inducción de la tolerancia al trasplante, en la reparación y regeneración de tejidos, y en la vehiculización celular de fármacos o compuestos biológicamente activos a los sitios de interés, por ejemplo, a tumores o a zonas de daño tisular.

15 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de materia seleccionada entre una SP-CMM de la invención, una población celular de la invención, y una composición de CMM de la invención para su empleo en el tratamiento de una enfermedad autoinmune; o, expresado de forma alternativa, con el uso de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de 20 CMM de la invención en la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar una enfermedad autoinmune.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de materia seleccionada entre una SP-CMM de la invención, una población celular de la invención, y una 25 composición de CMM de la invención para su empleo en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria; o, expresado de forma alternativa, con el uso de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención en la preparación de un medicamento para prevenir y/o tratar una enfermedad inflamatoria.

30

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes incluyen, la enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, anemia hemolítica, anemia perniciosa, aftas, estomatitis aftosa, artritis,

- arterioesclerosis, osteoarthritis, artritis reumatoide, aspermiogénesis, asma bronquial, asma autoinmune, hemólisis autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma de Burkitt, enfermedad de Crohn, coroiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, crioglobulinemia, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedades demielinizantes autoinmunes, contractura de Dupuytren, encefalomielitis, encefalomielitis alérgica, endoftalmia, enteritis alérgica, síndrome enteropatía autoinmune, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiomática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Harnman-Rich, enfermedad de Hashimoto, pérdida repentina de audición, hepatitis crónica, enfermedad de Hodgkin, hemoglobinuria paroximástica, hipogonadismo, ileitis regionales, iritis, leucopenia, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis traversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, pénfigo vulgar, poliartritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, poliradiculitis aguda, psoriasis, purpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, infertilidad debida a anticuerpos anti-espermatozoides, trombocitopenia, timoma, uveitis anterior aguda, vitílico, enfermedades asociadas al SIDA, SCID y virus de Epstein Barr tales como el síndrome de Sjögren, el linfoma de células B asociado a SIDA o a virus de Epstein-Barr, enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis y estados inmunosuprimidos tales como infecciones virales tras trasplantes, SIDA, cáncer, hepatitis activa crónica, el rechazo de trasplante a consecuencia del trasplante de un tejido u órgano y la enfermedad de injerto contra huésped que puede resultar del trasplante de médula ósea o de células troncales hematopoyéticas.

La capacidad inmunomoduladora de las CMM no solo tiene importancia en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, sino que también se perfilan como un elemento de tratamiento indispensable para propiciar la tolerancia hacia órganos sólidos tales como el corazón, pulmón y riñón; a modo ilustrativo, es posible la co-infusión de CMM en el momento del trasplante.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de materia seleccionada entre una SP-CMM de la invención, una población celular de la invención, y una composición de CMM de la invención para su empleo en la inducción de tolerancia a un trasplante; o, expresado de forma alternativa, con el uso de una SP-

- 5 CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención en la preparación de un medicamento para inducir tolerancia a un trasplante.

Una vez que las CMM entran al torrente sanguíneo, son capaces de detectar las

- 10 moléculas que son secretadas por los tejidos dañados o moribundos en lo que se conoce como el fenómeno de “*homing*” o anidamiento. Una vez que está en la proximidad del tejido dañado, la CMM se adhiere a la superficie del órgano a través de receptores moleculares que expresa en la superficie de la membrana celular. Esto da inicio a una serie de eventos que permiten a la CMM integrarse al órgano dañado y comenzar a
15 secretar factores de crecimiento que estimulan localmente a las células madre residentes del propio órgano afectado, además de cambiar el microambiente inflamatorio para dar origen a un microambiente permisible a la regeneración celular, en donde comienza un proceso de fusión o diferenciación celular convirtiéndose entonces en una célula fisiológicamente madura, además de propiciar la formación de nuevos
20 vasos sanguíneos.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de materia seleccionada entre una SP-CMM de la invención, una población celular de la invención, y una composición de CMM de la invención para su empleo en la reparación y regeneración de tejidos; o, expresado de forma alternativa, con el uso de una SP-CMM

- 25 de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención en la preparación de un medicamento para la reparación y regeneración de tejidos.

- 30 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una SP-CMM de la invención, o una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención como sistema de transporte o vehículo (“*delivery system*”) de un compuesto biológicamente activo a un sitio de interés, es decir, al sitio en el que se desea que el

compuesto biológicamente activo ejerza su efecto, tal como un tumor o a una zona de daño tisular.

Un “compuesto biológicamente activo” tal como aquí se utiliza se refiere a un compuesto que ejerce un efecto en el organismo de un sujeto que lo recibe, por ejemplo, un efecto terapéutico, e incluye proteínas, péptidos, hormonas, enzimas, compuestos químicos de bajo peso molecular, etc.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de compuestos biológicamente activos susceptibles de ser vehiculizados mediante las SP-CMM de la invención incluyen proteínas terapéuticas tales como eritropoyetina (EPO), hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), hormona liberadora de hormona somatotropa (GHRH), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona somatotropa o del crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), tirotropina (TSH u hormona estimulante del tiroides), prolactina, oxitocina, hormona antidiurética (ADH o vasopresina), melatonina, factor inhibidor Mülleriano, calcitonina, hormona paratifoidea, gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina, factor de crecimiento tipo insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento tipo insulina tipo II (IGF-II), péptido natriurético atrial (PNA), gonadotrofina coriónica humana (GCH), insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (PP), leptina, neuropéptido Y, renina, angiotensina I, angiotensina II, factor VIII, factor IX, factor tisular, factor VII, factor X, trombina, factor V, factor XI, factor XIII, interleuquina 1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8 y chemoquinas), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 16 (IL-16), interferones alfa, beta, gamma, factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF y relacionados), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento glial, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento endotelial,

antitripsina 1 alfa, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), ciclosporina, fibrinógeno, lactoferrina, activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), quimotripsina, inmunoglobinas, hirudina, superóxido dismutasa, imiglucerasa, etc.

5

Adicionalmente, la invención también se relaciona con:

- un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad autoinmune o inflamatoria que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención a un sujeto que padece dicha enfermedad;
- un método para inducir tolerancia a un trasplante que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento, por ejemplo, un sujeto que va a recibir o ha recibido un trasplante;
- un método para la reparación y regeneración de tejidos que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento; o
- un método para vehiculizar un compuesto biológicamente activo a un sitio de interés, tal como un tumor o a una zona de daño tisular, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una SP-CMM de la invención, o de una población celular de la invención, o de una composición de CMM de la invención que comprenden dicho compuesto biológicamente activo a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

En general, para su aplicación en dichos métodos, dicha SP-CMM de la invención, dicha población celular de la invención, o dicha composición de CMM de la invención, 30 se administrarán en forma de una composición farmacéutica de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

- 5 Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

10

EJEMPLO 1

Estudio jerárquico de los genes diferencialmente expresados en SP-CMM versus MO-CMM y en SP-CMM versus TA-CMM

I. MATERIALES Y MÉTODOS

15

Aislamiento y cultivo de Células Madre Mesenquimales (CMM)

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (SP) humana en tubos heparinizados, previo consentimiento informado, de donantes del Hospital Niño Jesús de Madrid. Las 20 células mononucleares fueron aisladas mediante centrifugación (400 g, 25 minutos, 20°C) de las muestras heparinizadas en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences). La fracción de células mononucleares se lavó 2 veces con PBS y se sedimentó (600 g, 5 minutos, temperatura ambiente). A continuación, se resuspendieron las células en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 25 suplementado con 20% de suero de ternera fetal.

Las células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica humana se sembraron en frascos de cultivo recubiertos con fibronectina con el fin de obtener células madre mesenquimales (CMM) procedentes de sangre periférica humana. Tras 24 horas de 30 cultivo se eliminaron las células no adheridas a la placa de cultivo y se añadió medio fresco. Cuando el cultivo alcanzó la semiconfluencia, las células fueron tripsinizadas, lavadas con medio de cultivo, sedimentadas (600 g, 10 minutos, temperatura ambiente) y replaqueadas a una concentración de 4×10^3 células/cm². A partir del tercer pase se

obtuvo una población de CMM homogénea, que se mantuvo en medio de cultivo comercial MesenPRO Medium (Gibco) para la realización de los experimentos.

Las CMM procedentes de médula ósea (MO-CMM) así como las CMM de tejido adiposo (TA-CMM) fueron adquiridas a Inbiobank (San Sebastián, España) (http://www.inbiomed.org/Index.php/desarrollo_tecnologico/inbiobank/INB/inb_MAIN?Pg=index).

Todas las CMM fueron caracterizadas en base a su morfología, marcadores de membrana y potencial de diferenciación *in vitro*.

Caracterización fenotípica y funcional de las CMM

Las CMM obtenidas fueron caracterizadas en base a los siguientes criterios:

- 15 - Caracterización morfológica: se observan células con morfología fibroblastoide, alargadas y estrechas, de gran tamaño, con mucha eucromatina nuclear y en el citoplasma abundantes lisosomas.
- 20 - Caracterización por citometría de flujo: La expresión de los receptores se analizó por citometría de flujo multiparamétrica (FACS) utilizando anticuerpos monoclonales humanos conjugados con fluorocromos. Las células se resuspendieron en 200 µL de PBS con 5% de inmunoglobulina humana para favorecer las uniones específicas. Se utilizaron 1×10^5 células en cada medida, incubando dichas células con cantidades definidas de anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) (18-22°C), en oscuridad, y resuspendidas en PBS antes de su análisis por citometría de flujo. Como control negativo las células fueron incubadas con las mismas concentraciones de anticuerpos isotipos. El análisis se llevó a cabo con un citómetro FACS Canto.
- 25 - Caracterización funcional: las CMM se caracterizan por poseer la capacidad de diferenciarse, con medios específicos, hacia tipos celulares tales como adipocitos y osteocitos. Con el fin de evaluar dicha capacidad, cultivos

confluentes de CMM fueron incubados durante dos semanas en medios definidos para cada tipo de diferenciación que consisten en:

- Diferenciación osteogénica: Medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) suplementado con dexametasona 0,1 µM, betaglicerolfosfato 10 mM y ácido ascórbico 0,2 mM.
- Diferenciación adipogénica: Medio IMDM suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, hidrocortisona 1 µM e indometacina 0,1 mM.

Posteriormente, se analizaron los cultivos diferenciados por técnicas histológicas. Las células se tiñeron con colorantes específicos, tales como “Alizarin Red” para los osteocitos y “Oil Red O” para los adipocitos

15

Aislamiento, marcaje e hibridación del ARN

Se obtuvieron CMM humanas de varios donantes y se expandieron en cultivo celular. Se prepararon 3 réplicas biológicas de cada muestra, las cuales fueron expandidas *in vitro* de forma independiente. Los *pellets* celulares de cada muestra se estabilizaron con PrepProtectTM. En total, se realizaron 24 experimentos de microarray.

El ARN se aisló utilizando un protocolo estándar (NucleoSpin R RNA II, Macherey-Nagel), y su calidad fue comprobada utilizando un analizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Los resultados del analizador fueron visualizados corriendo un gel. Además, el software generó el “RNA Integrity Number (RIN)” para certificar la pureza y calidad de las muestras de ARN. El valor RIN (Relación Internacional Normalizada) se calcula en base a un algoritmo que tiene en cuenta diversos parámetros, muchos de ellos basados en ARN ribosómicos (ARNr). En definitiva, un RIN de 10 indica una gran calidad del ARN, mientras que un RIN de 1 indicaría un ARN de baja calidad. Las muestras empleadas obtuvieron valores de RIN de entre 7,3 y 10, lo que indica su alta calidad.

Para marcar el ARN con Cy3 (marcador fluorescente), las muestras de ARN se amplificaron y marcaron utilizando el kit “Agilent Low RNA Input Linear Amp Kit” (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARNc y la tasa de incorporación del marcador fluorescente (Cy3) fueron evaluadas con un 5 espectofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies).

El procedimiento de hibridación se realizó utilizando el kit “Agilent Gene Expression Hybridization Kit” (Agilent Technologies). Finalmente, se hibridaron los ARNc fragmentados marcados con Cy3 con “Whole Human Genome Oligo Microarrays 10 4x44K” utilizando la tecnología de Agilent. Los microarrays se lavaron con tampón SSPE 6x contenido 0,005% de N-laurilsarcosina durante 1 minuto a temperatura ambiente seguido por otro lavado con tampón SSPE 0,06x contenido 0,005% de N-laurilsarcosina durante 1 minuto a 37°C. Finalmente se realizó un último lavado con acetonitrilo durante 30 segundos.

15

Imagen y análisis de datos

La detección de la señal de fluorescencia de la hibridación de los microarrays de Agilent se realizó mediante el escáner “Agilent Technologies Scanner G2505C” 20 (Agilent Technologies). El programa “Agilent Feature Extraction Software” (FES) se usó para leer y procesar los archivos de las imágenes de los microarrays. Dicho programa determina la intensidad de cada elemento (incluyendo la corrección del ruido de fondo), elimina los valores extremos y calcula la significación estadística.

25 Características de los arrays

Los experimentos de microarrays de ADN son muy potentes para la investigación de cambios transcripcionales a gran escala. Para este estudio, se hibridó el ARN obtenido utilizando el kit “Whole Human Genome Oligo Microarray Kit”. Estos microarrays 30 contienen aproximadamente 44.000 sondas, que incluyen más de 41.000 elementos del genoma humano. Las secuencias se obtuvieron a partir de las bases de datos RefSeq, Ensembl y GenBank. Cada sonda de oligonucleótidos (60-mer) se imprimió directamente sobre el *array* mediante la tecnología “Agilent SurePrint”. Todos los

procedimientos para la hibridación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (<http://www.agilent.com>). La intensidad de la fluorescencia se obtuvo por medio del escáner Agilent Technologies Scanner G2505C y los valores se procesaron mediante el programa “Feature Extraction Software” Versión

5 10.2.1.3.

Datos de expresión génica

Los datos de expresión génica consisten en datos de microarrays de 24 muestras de

10 CMM. Las muestras fueron separadas en tres grupos en función de su procedencia:

- MO-CMM: derivadas de médula ósea;
- TA-CMM: derivadas de tejido adiposo; y
- SP-CMM: derivadas de sangre periférica movilizada.

15 A efectos del estudio, los grupos MO-CMM y TA-CMM fueron considerados como los grupos de referencia. Ambos están compuestos por tres muestras diferentes. Por otro lado, el grupo SP-CMM fue considerado como el grupo de estudio o de ensayo. Dicho grupo estaba compuesto por dos muestras. Con el fin de garantizar la buena calidad en los resultados y minimizar los sesgos metodológicos, todas las muestras se hibridaron
20 por triplicado.

Pre-procesamiento de los datos

El pre-procesamiento de las intensidades crudas de las sondas es un procedimiento
25 clave en el análisis de los datos de expresión génica provenientes de microarrays. Brevemente, la corrección del ruido de fondo y la normalización son necesarias para minimizar el efecto de posibles variaciones en las condiciones experimentales. El programa “Feature Extraction Software” proporciona, además de los valores de intensidad crudos, los valores obtenidos al corregir el ruido de fondo. Sin embargo, con el fin de obtener resultados robustos, se hace necesario un pre-procesamiento más específico. De esta forma, para el proceso de pre-procesamiento se partió de los datos crudos y se aplicaron los métodos existentes en el ampliamente conocido paquete R “Limma” (Linear Models for Microarray Data)

[<http://bioinf.wehi.edu.au/limma/> o <http://www.bioconductor.org>]. Debido a que se utilizaron microarrays de un solo color el proceso de pre-procesamiento para cada uno de los dos experimentos consistió en tres pasos diferenciados:

- 5 i) Corrección del ruido de fondo de los datos iniciales. Para esta tarea se aplicó el método “normexp+offset”, calculando la probabilidad máxima por medio de la aproximación de punto de silla. Se seleccionó un valor de desplazamiento de 50 a fin de estabilizar los cálculos con intensidades bajas.
- 10 ii) Proceso de Normalización. Los datos provenientes del paso anterior se normalizaron mediante la aplicación del método de normalización por cuantiles.
- 15 iii) Generación de la matriz de expresión. Para esta tarea se calculó la media de las tres réplicas de cada muestra, a fin de obtener un valor de intensidad único para cada gen en cada muestra.

Análisis de microarrays

20 *Expresión génica*

Como primer paso en el análisis de los datos pre-procesados, se identificaron los genes expresados diferencialmente presentes en los experimentos. Estos genes fueron identificados mediante la aplicación del método “*two-class unpaired*” del programa de análisis de significación de microarrays (SAM, “Significance Analysis of Microarrays”) [Tusher, V. *et al.* 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98: 5116-5121]. SAM ordena los genes basándose en un estadístico de t-test modificado. Los valores más altos implican una expresión diferencial más significativa de los genes en cuestión. Este estadístico mejora los enfoques tradicionales “*fold-change*” o t-test [Jones, J.O. y Arvin, A.M. 2003. Journal of Virology, 77:1268-1280; Smyth, G.K. *et al.* 2003. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. In Functional Genomics: Methods and Protocols. Edited by Brownstein M.J. *et al.* USA: Humana Press: 111-136]. Una de las principales ventajas de utilizar SAM es que se estima una tasa global

de descubrimiento de falsos positivos (FDR), definida como la fracción de genes que es probable que se identifiquen de forma incorrecta significativamente regulados. Por otra parte, SAM proporciona un parámetro (denominado “delta”) que permite variar la relación entre verdaderos y falsos positivos. Para cada experimento se seleccionó un 5 valor delta que optimiza dicha relación.

Cada experimento consistió en 24 microarrays (9 de médula ósea / 9 de tejido adiposo y 6 de sangre periférica). Como consecuencia de ello, SAM fue capaz de encontrar genes regulados de manera significativa aunque presenten bajas variaciones en los niveles de 10 expresión. Con el fin de obtener resultados con un impacto significativo biológicamente hablando, se fijó un nivel mínimo para la variación de la expresión de 2 veces a lo largo del análisis de todos los experimentos.

15

II. RESULTADOS

Identificación de genes expresados diferencialmente

Como primer paso se caracterizaron las diferencias entre la expresión génica de SP-20 CMM frente MO-CMM. Para ello, se diseñó un experimento de microarrays compuesto por 15 arrays (9 de MO-CMM y 6 de SP-CMM). Los datos fueron pre-procesados y normalizados tal y como se indica en la sección Materiales y Métodos. Para la identificación de genes expresados diferencialmente se aplicó el método ampliamente conocido “*two-class unpaired*” del programa de análisis de significación (SAM). De 25 este modo, se obtuvo una lista de genes cuya expresión diferencial era significativa muchos de los cuales presentaron cambios muy bajos en el nivel de expresión. Debido a que el impacto biológico de los genes con pequeñas diferencias en la expresión no es claro, se utilizó un umbral adicional para el cambio de expresión de 2 veces en el análisis de todos los experimentos. De esta forma, se encontraron 582 genes que 30 mostraron al menos un cambio de 2 veces en su expresión. En la Tabla 2 se muestran los 10 genes con mayor sobre-expresión y los 10 genes con mayor sub-expresión.

Tabla 2

Los 10 genes más sobre-/sub-expresados para el experimento de SP-CMM frente a MO-CMM

Nombre del gen	Veces	Descripción
MMP3	5,28181	metalopeptidasa de la matriz 3
EPB41L3	4,27615	banda de proteína de membrana de eritrocitos 3 de tipo 4.1
HOXD10	4,19675	caja homeótica D10
IL13RA2	4,10385	receptor alfa-2 de interleuquina 13
PSG9	3,95345	beta-1-glicoproteína específica del embarazo 9
SPON2	3,95111	espondina 2, proteína de la matriz extracelular
S100A4	3,94677	proteína de unión a calcio S100 A4, variante de transcripto 1
RGC32	3,92293	gen de respuesta al complemento 32
PSG6	3,83146	beta-1-glicoproteína específica del embarazo 6, variante de transcripto 1
PSG11	3,67165	beta-1-glicoproteína específica del embarazo 11, variante de transcripto 1
HAS1	-3,2971	hialuronano sintasa 1
VCAM1	-3,3384	molécula de adhesión celular vascular 1, variante de transcripto 1
HLA-DPA1	-3,3512	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alfa 1
FAM101A	-3,5188	familia con similitud de secuencia 101, miembro A
CPZ	-3,5381	carboxipeptidasa Z, variante de transcripto 3
IGFBP2	-3,7182	proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, de 36 kDa
PRG4	-3,7918	proteoglicano 4
NGEF	-3,8977	factor de intercambio de nucleótidos de guanina neuronal
AK126405	-3,9280	ADNc de FLJ44441 fis
CRLF1	-4,4739	factor 1 similar al receptor de citoquinas

- 5 A continuación, se caracterizaron las diferencias entre la expresión de genes en las SP-CMM frente a TA-CMM. Para este experimento de microarrays se hizo uso de 15 arrays (9 para TA-CMM y 6 para SP-CMM), aplicando el procedimiento descrito anteriormente para el pre-procesamiento y la normalización. Por otra parte, la lista de genes cuya expresión diferencial era significativa también se obtuvo mediante la
- 10 aplicación del método de SAM “*two-class unpaired*”. Como se ha comentado anteriormente, se seleccionaron aquellos genes que presentaron al menos un cambio de 2 veces en la expresión para su posterior análisis. De los 492 genes que cumplen con este criterio, 103 también fueron encontrados en el caso de SP-CMM frente MO-CMM.

En la Tabla 3 se indican los 10 genes con mayor sobre-expresión y los 10 genes con mayor sub-expresión.

Tabla 3

5 Los 10 genes más sobre-/sub-expresados para el experimento de SP-CMM frente a TA-CMM

Nombre del gen	Veces	Descripción
RPS4Y1	9,28352	proteína ribosómica S4, ligada al cromosoma Y 1
RPS4Y2	8,94935	proteína ribosómica S4, ligada al cromosoma Y 2
A_24_P238386	5,42536	-
RBP4	5,05374	proteína de unión a retinol 4, plasmática
KRTAP1-5	4,27613	proteína asociada a queratina 1-5
MMP3	3,92610	metalopeptidasa de la matriz 3
FOXF1	3,67725	caja Forkhead F1
EFNB2	3,61010	efrina-B2
RGC32	3,53645	genes de respuesta al complemento 32
RASIP1	3,49038	proteína de interacción con Ras 1
HAS1	-2,8592	hialuronano sintasa 1
NGEF	-2,8871	factor de intercambio de nucleótidos de guanina neuronal
FAM20A	-2,9862	familia con similitud de secuencia 20, miembro A
AGC1	-3,0010	agrecono 1, variante de transcripto 2
ENST00000340455	-3,0430	ADNc de FLJ46111 fis, clon TESTI2034913
A_24_P93321	-3,0613	-
A_24_P357836	-3,0858	-
C20orf39	-3,1417	marco de lectura abierto 39 del cromosoma 20
FMOD	-3,3144	fibromodulina
SCRG1	-3,6296	proteína sensible a scrapie 1

10

Finalmente, se investigaron los candidatos a biomarcadores de CMM. Se encontraron 217 y 209 biomarcadores sobre-expresados para los experimentos SP-CMM frente MO-CMM y SP-CMM frente TA-CMM, respectivamente. Este estudio se ha centrado en las proteínas localizadas en la membrana plasmática, que son los biomarcadores más fáciles de utilizar para detectar y aislar SP-CMM por clasificación de la célula o métodos magnéticos. Así, se obtuvieron 42 y 40 biomarcadores localizados en la membrana plasmática para los casos de SP-CMM frente a MO-CMM y SP-CMM frente a TA-

CMM, respectivamente. La Tabla 4 muestra los marcadores biológicos comunes para los dos experimentos.

Tabla 4

5

Biomarcadores comunes ubicados en la membrana plasmática

Símbolo	Nombre	Veces de SP-CMM frente a TA-CMM	Veces de SP-CMM frente a MO-CMM
CAMK2N1	Inhibidor 1 de la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina	2,529	2,015
CDH10	Cadherina 10, tipo 2	1,948	2,801
CLDN11	Claudina 11	1,415	1,698
IL13RA2	Receptor alfa 2 de interleuquina 13	2,581	4,104
LSAMP	Proteína de membrana asociada al sistema límbico	1,927	1,093
PSCA	Antígeno de células madre de la próstata	2,028	1,256
SFRP1	Proteína 1 relacionada con Frizzled secretada	1,738	2,418

III. CONCLUSIONES

10 Se han generado y caracterizado CMM humanas a partir de sangre periférica (SP-CMM) y se han comparado los perfiles de expresión génica de esas células con otras CMM humanas obtenidas de médula ósea (MO-CMM) o tejido adiposo (TA-CMM).

15 Se ha encontrado una alta similitud en los perfiles de expresión entre SP-CMM, MO-CMM y TA-CMM, lo que sugiere que cualquier población de CMM derivada de cualquier tejido puede definirse con similares características moleculares. Tal como se esperaba, la mayoría de los genes que tenían expresión diferencial codificaban proteínas extracelulares, lo que indica que las CMM circulantes cambian su expresión génica como una adaptación al nuevo entorno no-sólido, es decir, la sangre periférica. En 20 particular, hay numerosos genes que están expresados diferencialmente en SP-CMM con respecto a MO-CMM y TA-CMM.

REIVINDICACIONES

1. Una célula madre mesenquimal, aislada, procedente de sangre periférica o de sus hemoderivados, caracterizada porque expresa el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2).
5
2. Célula madre mesenquimal aislada según la reivindicación 1, obtenible mediante un método que comprende detectar el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2) en la superficie de dicha célula y aislar dicha célula que expresa IL13RA2.
10
3. Célula madre mesenquimal según la reivindicación 1, caracterizada porque además, expresa uno o más marcadores de membrana plasmática seleccionados del grupo que consiste en CAMK2N1, CDH10, CLDN11, LSAMP, PSCA y SFRP1.
15
4. Célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha sangre periférica o hemoderivado es de origen humano.
5. Célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sangre periférica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada y sin movilizar obtenida por técnicas de aféresis fresca o criopreservada, fracción CD34- fresca o criopreservada obtenida de sangre periférica o sus hemoderivados movilizada, "*buffy coats*" y cualquiera de sus combinaciones.
20
25
6. Célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sangre periférica procede de un sujeto al que se le ha administrado un factor de estimulación.
30
7. Célula madre mesenquimal según la reivindicación 6, en la que el factor de estimulación se selecciona del grupo formado por el factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de colonias

granulomacrocágicas (GM-CSF), un antagonista del receptor CXCR4, una catecolamina, y sus combinaciones.

8. Una población celular aislada que comprende células madre mesenquimales procedentes de sangre periférica o de sus hemoderivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
5
9. Una composición de células madre mesenquimales procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, en la que, al menos, el 50% de las células madre mesenquimales procedentes de sangre periférica, o de sus hemoderivados, que comprende dicha composición son células madre mesenquimales que expresan IL13RA2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10
10. Una composición farmacéutica que comprende una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una población celular según la reivindicación 8, o una composición de células madre mesenquimales según la reivindicación 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15
11. Método *in vitro* para la identificación y/o el aislamiento de una célula madre mesenquimal a partir de sangre periférica o de sus hemoderivados que comprende detectar la expresión del receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2) en células de una muestra de sangre periférica o de sus hemoderivados y, si se desea, aislar dichas células que expresan IL13RA2.
20
12. Método según la reivindicación 11, en el que la sangre periférica utilizada se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada fresca o criopreservada, sangre periférica movilizada y sin movilizar obtenida por técnicas de aféresis fresca o criopreservada, fracción CD34- fresca o criopreservada obtenida de sangre periférica o sus hemoderivados
25 movilizada, “buffy coats”, y cualquiera de sus combinaciones.
30

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicha sangre periférica procede de un sujeto al que se le ha administrado un factor de estimulación.

5 14. Método según la reivindicación 13, en el que dicho factor de estimulación se selecciona del grupo formado por el factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de colonias granulomacrocíticas (GM-CSF), un antagonista del receptor CXCR4, una catecolamina, y sus combinaciones.

10

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicha sangre periférica o hemoderivado es de origen humano.

15

16. Uso del receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2) como marcador de una célula madre mesenquimal procedente de sangre periférica o de sus hemoderivados.

17. Uso según la reivindicación 16, para la identificación y/o el aislamiento *in vitro* de una célula madre mesenquimal a partir de sangre periférica, o de un hemoderivado de la misma, de un sujeto.

20

18. Uso de un reactivo capaz de detectar el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2) para la identificación y/o el aislamiento de una célula madre mesenquimal a partir de sangre periférica o de sus hemoderivados, en donde dicho reactivo es un anticuerpo que se une específicamente a IL13RA2.

25

19. Uso de una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una población celular según la reivindicación 8, o de una composición de células madre según la reivindicación 9, o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de 30 una enfermedad autoinmune.

20. Uso de una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una población celular según la reivindicación 8, o de una composición de

células madre según la reivindicación 9, o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

- 5 21. Uso de una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una población celular según la reivindicación 8, o de una composición de células madre según la reivindicación 9, o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la preparación de un medicamento para inducir tolerancia al trasplante.

10

22. Uso de una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una población celular según la reivindicación 8, o de una composición de células madre según la reivindicación 9, o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la preparación de un medicamento para la reparación y regeneración de tejidos.

- 15 23. Uso de una célula madre mesenquimal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a

7, o de una población celular según la reivindicación 8, o de una composición de células madre según la reivindicación 9, o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10, como sistema de transporte o vehículo de un compuesto biológicamente activo a un sitio de interés.

20

A)

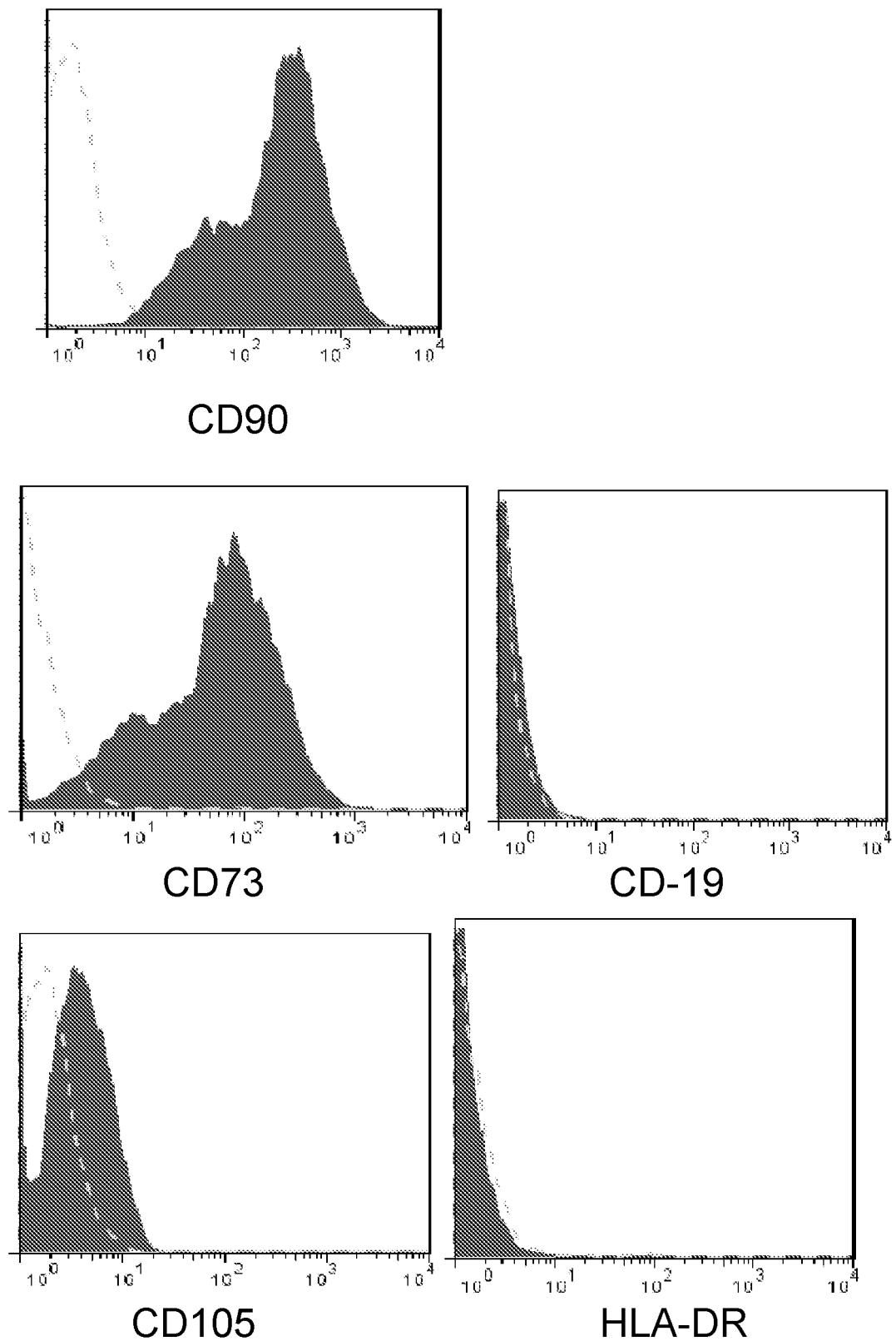


FIG. 1

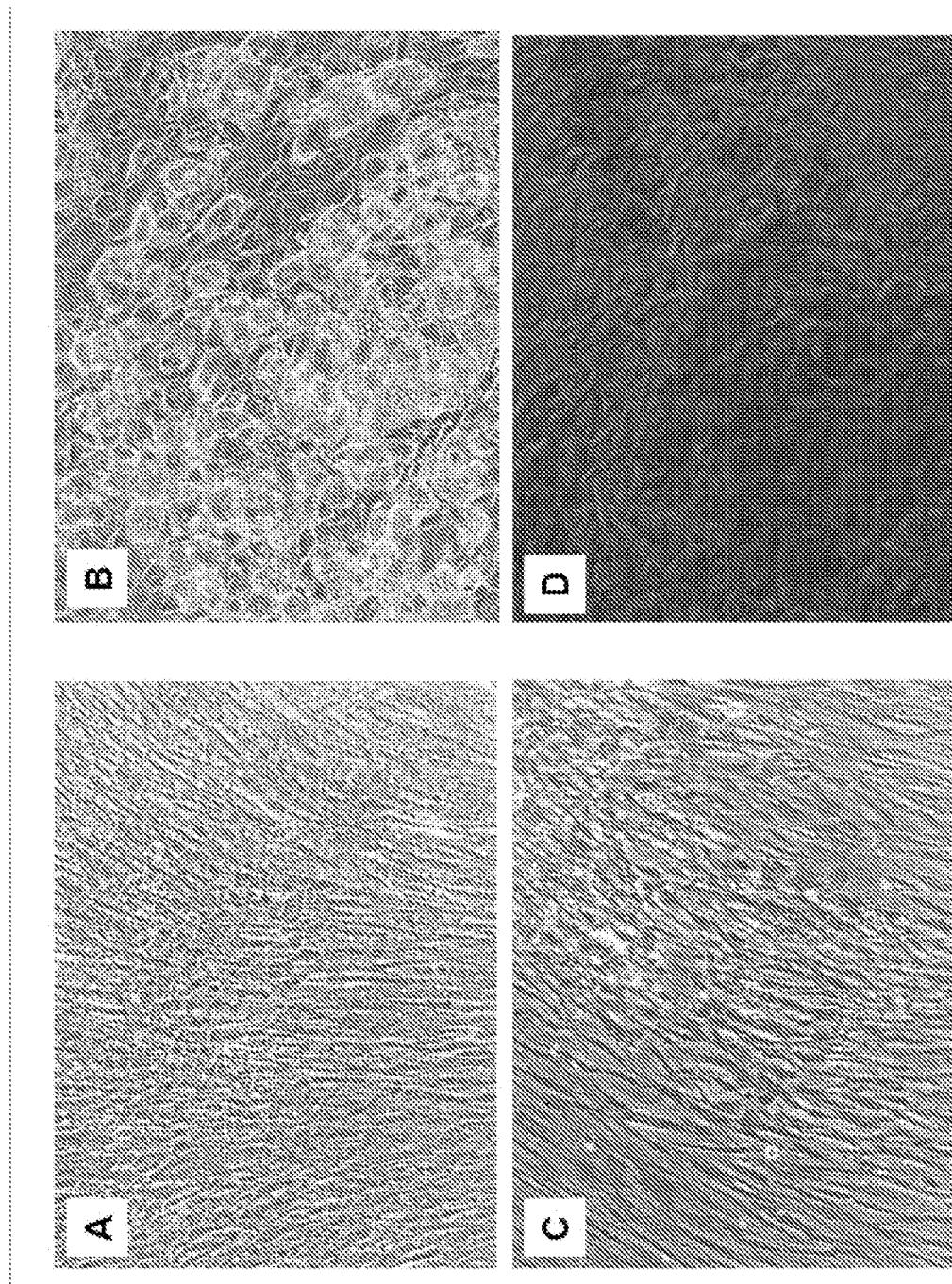


FIG. 2

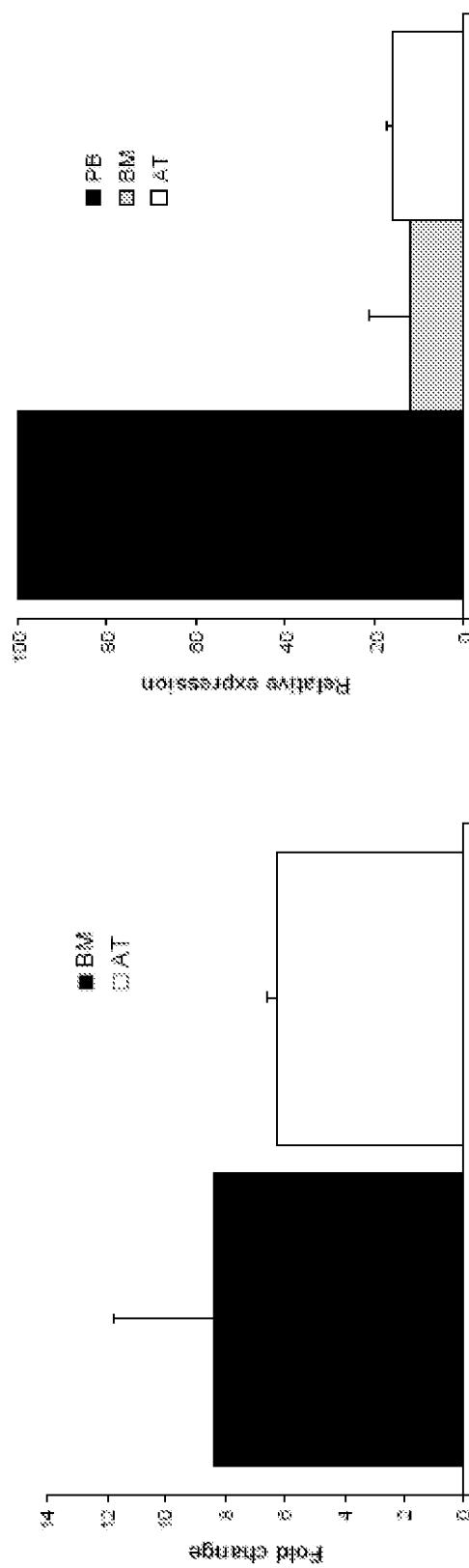


FIG. 3

ES 2 384 790 B1

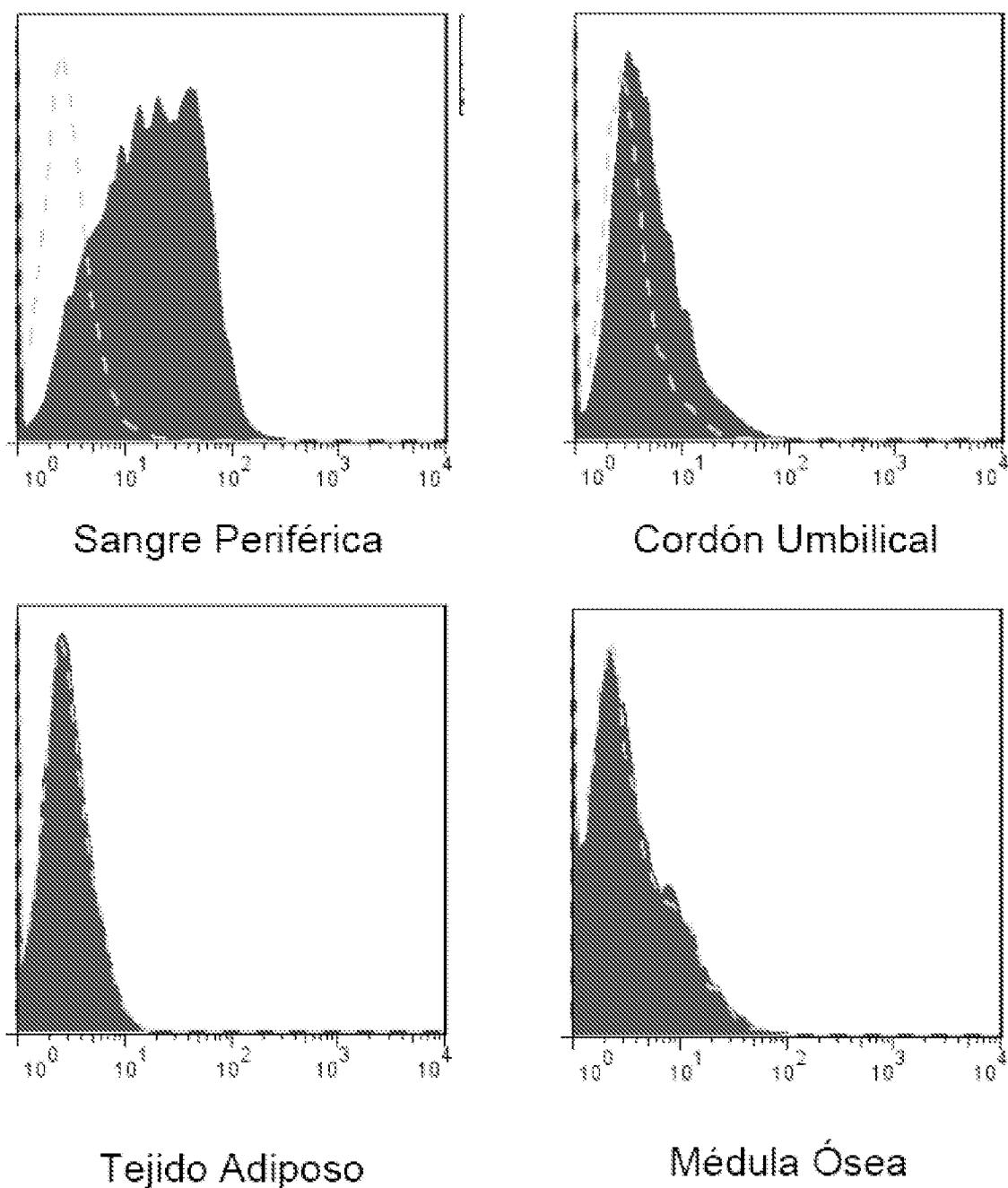


FIG. 4

ES 2 384 790 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Salud Carlos III
Universidad de Granada
Fundación Progreso y Salud

<120> Células madre mesenquimales aisladas procedentes de sangre periférica

<130> P5905ES00

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Phe Val Cys Leu Ala Ile Gly Cys Leu Tyr Thr Phe Leu Ile
1 5 10 15

Ser Thr Thr Phe Gly Cys Thr Ser Ser Ser Asp Thr Glu Ile Lys Val
20 25 30

Asn Pro Pro Gln Asp Phe Glu Ile Val Asp Pro Gly Tyr Leu Gly Tyr
35 40 45

Leu Tyr Leu Gln Trp Gln Pro Pro Leu Ser Leu Asp His Phe Lys Glu
50 55 60

Cys Thr Val Glu Tyr Glu Leu Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ser Glu Thr
65 70 75 80

Trp Lys Thr Ile Ile Thr Lys Asn Leu His Tyr Lys Asp Gly Phe Asp
85 90 95

Leu Asn Lys Gly Ile Glu Ala Lys Ile His Thr Leu Leu Pro Trp Gln
100 105 110

Cys Thr Asn Gly Ser Glu Val Gln Ser Ser Trp Ala Glu Thr Thr Tyr
115 120 125

Trp Ile Ser Pro Gln Gly Ile Pro Glu Thr Lys Val Gln Asp Met Asp
130 135 140

Cys Val Tyr Tyr Asn Trp Gln Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Lys Pro Gly
145 150 155 160

ES 2 384 790 B1

Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu
165 170 175

Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp Tyr Ile Lys Ala Asp Gly
180 185 190

Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu Glu Ala Ser Asp Tyr Lys
195 200 205

Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser Glu Asn Lys Pro Ile Arg
210 215 220

Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn Ile Val Lys Pro Leu Pro
225 230 235 240

Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser Ser Cys Glu Ile Lys Leu
245 250 255

Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro Ala Arg Cys Phe Asp Tyr
260 265 270

Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr Leu Val Thr Ala Thr Val
275 280 285

Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr Asn Glu Thr Arg Gln Leu
290 295 300

Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile Tyr Cys Ser Asp Asp Gly
305 310 315 320

Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys Trp Glu Gly Glu Asp Leu
325 330 335

Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu
340 345 350

Ile Leu Val Ile Phe Val Thr Gly Leu Leu Leu Arg Lys Pro Asn Thr
355 360 365

Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp Thr
370 375 380



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

②1 N.º solicitud: 201031821

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2010

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: C12N5/0789 (2010.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2006166214 A1 (KATO YUKIO et al.) 27.07.2006, todo el documento, especialmente resumen; párrafos [0012],[0035]; ejemplo 4; tabla 3; reivindicaciones 2,18.	1-23
A	WO 9901145 A1 (OSIRIS THERAPEUTICS INC) 14.01.1999, todo el documento, especialmente resumen; ejemplo 1; reivindicaciones.	1-23
A	ES 2326772 A1 (FUNDACION PROGRESO Y SALUD) 19.10.2009, todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 26.03.2012	Examinador B. Pérez Esteban	Página 1/4
--	--------------------------------	---------------

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, XPSPRNG, EBI (UniProt), GeneCards.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23 Reivindicaciones	SI NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2006166214 A1 (KATO YUKIO et al.)	27.07.2006
D02	WO 9901145 A1 (OSIRIS THERAPEUTICS INC)	14.01.1999
D03	ES 2326772 A1 (FUNDACION PROGRESO Y SALUD)	19.10.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica células madre mesenquimales (CMM) aisladas de sangre periférica (movilizada o no) que expresan el receptor alfa-2 de la interleuquina 13 (IL13RA2), y al menos uno de los marcadores de membrana CAMK2N1, CDH10, CLDN11, LSAMP, PSCA Y SFRP1. También reivindica un método para la identificación y el eventual aislamiento de células madre mesenquimales en sangre periférica mediante la detección del marcador IL13RA2, y el uso de las mencionadas células para preparar un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias, para inducir tolerancia al transplante, para reparación tisular, o como sistema de transporte de compuestos biológicamente activos.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que, sólo o en combinación con otros, describa el procedimiento de la solicitud tal y como está reivindicado, ni procedimientos similares, por lo que la solicitud es nueva y tiene actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, respectivamente.

Se citan en este informe 3 documentos del estado de la técnica que, si bien están relacionados con la solicitud, no afectan su novedad ni su actividad inventiva.

El documento D01 divulga una serie de marcadores característicos de células madre mesenquimales, que, por tanto, pueden utilizarse para detectar estas células. Entre los marcadores se incluye el gen IL13RA2, y se muestra que su expresión es 6 veces más alta en células madre mesenquimales que en fibroblastos. Sin embargo, en el documento no se indica en ningún caso que este marcador se exprese de forma diferencial en las CMM de sangre periférica, que es el objeto de la solicitud, por lo que D01 no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

En los documentos D02 y D03 se describen sendos procedimientos para obtener células madre mesenquimales de sangre periférica. En ninguno de ellos se emplea el marcador IL13RA2, ni se menciona la posible utilidad del mismo con este fin, por lo que estos dos documentos no afectan en modo alguno la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.