

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 009**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)
A61K 35/33 (2015.01)
A61K 35/36 (2015.01)
A61K 35/407 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014** **PCT/AU2014/001031**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15061839**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014** **E 14857985 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2024** **EP 3066193**

54 Título: **Método de cultivo celular**

30 Prioridad:

04.11.2013 AU 2013904257

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.10.2024

73 Titular/es:

ISOPOGEN PTY LTD (100.0%)
22 Bradbury Way
Samson, WA 6163, AU

72 Inventor/es:

STURM, MARIAN JUNE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 984 009 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de cultivo celular

5 Campo

La presente invención se refiere a métodos nuevos y mejorados para cultivar células estromales mesenquimales para la terapia. La invención se refiere a métodos para producir composiciones celulares y tisulares adecuadas para aplicaciones terapéuticas en un mamífero que necesita de un tratamiento terapéutico de células o tejidos.

Antecedentes

15 La terapia celular es un tratamiento cada vez más importante para varios tipos de trastornos, lesiones, neoplasias malignas y enfermedades. La terapia celular implica la infusión, aplicación o trasplante de células a un paciente, de manera que las células infundidas, aplicadas o trasplantadas se derivan de un donante distinto del paciente (alógenas) o del propio paciente (autólogas). Las células estromales mesenquimales (MSC) son un tipo de células que se han mostrado prometedoras para su uso terapéutico.

20 A pesar de lo prometedor de estas, los resultados clínicos obtenidos hasta la fecha con las MSC han sido en general deficientes. La razón principal de estos resultados clínicos deficientes parece deberse a la forma en que se han producido las MSC. Por ejemplo, la mayoría de las MSC se cultivan en suero fetal de ternera que después se elimina simplemente mediante el lavado de las células posterior a la cosecha. Sin embargo, este simple lavado puede no eliminar las proteínas bovinas unidas a la superficie celular o aquellas ubicadas dentro de las células que pueden más tarde incorporarse a la superficie celular externa. Estas células, en la implantación, parecerán entonces extrañas a los pacientes con anticuerpos contra proteínas bovinas presentes en su sangre (incidencia de aproximadamente el 40-50 % en la población australiana), serán reconocidas por el sistema inmunitario del paciente y serán destruidas antes de suministrar su beneficio terapéutico.

30 Spees y otros (2004; Molecular Therapy; 9(5): 747-756) describen experimentos diseñados para eliminar la contaminación por suero fetal de ternera de las MSC humanas para reducir la inmunogenicidad. Gregory y otros (2006; Stem Cells; 24: 2232-2243) describen métodos alternativos para cultivar las MSC mediante el uso de suero específico de especie.

35 Sin embargo, existe una necesidad permanente de métodos para producir células para la terapia celular.

Resumen

40 Los inventores han descubierto que las células pueden producirse de manera que se mejoren o resuelvan los problemas con los métodos de producción actuales, lo que ha conducido a resultados clínicos mejores.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para cultivar células estromales mesenquimales para la terapia que comprende las etapas de:

45 (i) cultivar una muestra de células estromales mesenquimales aisladas de un humano, un camélido, un equino, un canino o un felino en un primer medio de cultivo celular que comprende un primer suero, un primer sustituto de suero y/o una primera fracción de suero seleccionados del grupo que consiste en suero fetal de ternera (FCS) y suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) durante entre 18 h y 72 h, antes de cambiar el medio con un primer medio de cultivo celular fresco para continuar el cultivo hasta que las células hayan alcanzado una confluencia del 70 al 90 %; y

50 (ii) antes de cosechar las células para la terapia, dicho primer medio de cultivo celular se reemplaza con un segundo medio de cultivo celular que comprende un segundo suero, un segundo sustituto de suero y/o una segunda fracción de suero, cuyo suero o fracción de suero o sustituto de suero tiene la misma especie de origen que las células en cultivo y las células se cultivan durante 20 horas, o durante 21 horas, o durante 22 horas, o durante 23 horas, o durante entre 24 horas a 36 horas.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un método para cultivar células estromales mesenquimales humanas para la terapia que comprende las etapas de:

60 (i) cultivar las células estromales mesenquimales en un primer medio de cultivo celular que comprende DMEM suplementado con suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) hasta que dichas células alcancen aproximadamente una confluencia del 70-85 %; y

65 (ii) aproximadamente 24 horas antes de cosechar las células para la terapia, dicho primer medio de cultivo celular se elimina y se reemplaza con un segundo medio de cultivo celular que comprende DMEM sin rojo de fenol y con aproximadamente 2 % de albúmina sérica humana y después las células se cultivan durante aproximadamente 24 horas más.

En ciertas modalidades, la presente invención proporciona un método para cultivar células estromales mesenquimales humanas para la terapia celular que comprende las etapas de:

(i) cultivar entre $1,0 \times 10^3$ células por cm^2 del frasco de cultivo y $1,0 \times 10^{10}$ células por cm^2 del frasco de cultivo de células estromales mesenquimales en un primer medio de cultivo celular que comprende DMEM suplementado con suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) hasta que dichas células alcancen aproximadamente una confluencia del 70-85 %; y

(ii) aproximadamente 24 horas antes de cosechar las células para la terapia, dicho primer medio de cultivo celular se elimina y se reemplaza con un segundo medio de cultivo celular que comprende DMEM sin rojo de fenol y con aproximadamente 2 % de albúmina sérica humana y después las células se cultivan durante dichas aproximadamente 24 horas.

Los expertos en la técnica apreciarán que la etapa (i) del método requiere que la muestra de células se metabolice, se expanda o prolifere en número de células hasta que el frasco de cultivo que contiene las células alcance un nivel de confluencia para ser cosechadas. Por tanto, las condiciones de cultivo, lo que incluye los medios, deben ser suficientes para permitir una expansión óptima de las células cultivadas.

De acuerdo con las reivindicaciones, el suero, sustituto de suero y/o fracción de suero preferidos en el primer medio de cultivo celular es suero fetal de ternera (FCS) o suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS). Sin embargo, se conocen otras fuentes de nutrientes, hormonas y proteínas, lo que incluye la albúmina sérica, que es un componente importante del FCS. También otros sustitutos de suero tales como el lisado de plaquetas y productos comerciales tales como el sustituto de suero Ultrosor™ G (Pall Corporation, NY, EE.UU.); el sustituto de suero HIT™ que contiene albúmina sérica humana, insulina y transferrina en MDM de Iscove (Stemcell Technologies, BC, Canadá); el Serum Substitute Supplement™ (SSS™) que consiste en un 6 % de proteínas totales: contiene aproximadamente 84 % de albúmina sérica humana, 16 % de alfa y beta globulinas y < 1 % de gamma globulinas (Irvine Scientific, CA, EE.UU.) y el sustituto de proteínas séricas Quinns Advantage® (CooperSurgical Inc, CT, EE.UU.). Todos estos sustitutos de suero proporcionan el potencial osmótico, los factores de crecimiento y los nutrientes/proteínas correctos para permitir que la muestra de células se adhiera al frasco de cultivo y se expanda en número de células.

El segundo medio comprende un segundo suero, un segundo sustituto de suero y/o una segunda fracción de suero que tiene la misma especie de origen que las células en cultivo. Por ejemplo, si se cultivan células humanas, entonces el segundo medio comprenderá suero humano, sustituto de suero humano o albúmina sérica humana. Si se cultivan células equinas, entonces el segundo medio comprenderá suero de caballo, sustituto de suero de caballo o albúmina sérica de caballo. De manera similar, si se cultivan células caninas, entonces el segundo medio comprenderá suero canino, etcétera.

De acuerdo con las reivindicaciones, las células de la presente invención son células estromales mesenquimales (MSC).

Debe entenderse que los métodos de la presente invención pueden usarse para la terapia celular en un animal mamífero. En consecuencia, la muestra de células puede aislarse de un humano, un camélido, un equino, un canino o un felino.

Los expertos en la técnica apreciarán que el primer medio, al tiempo que contiene un primer suero, un primer sustituto de suero y/o una primera fracción de suero como se analizó *supra*, también comprenderá un medio base. Existen muchos medios base conocidos en la técnica, pero el medio base preferido puede seleccionarse del grupo que consiste en DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle (MEM), medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, M-199, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE o una de sus combinaciones. Preferentemente, el primer medio base es DMEM.

Preferentemente, el primer medio base se suplementa con suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS).

Los métodos de cultivo de células o tejidos son métodos estándar que se conocen bien en la técnica. Estos incluyen un intervalo de temperatura, por ejemplo, aproximadamente 37 °C, una concentración de CO₂, por ejemplo, 10 % de CO₂ y similares. Además, la cantidad de células en la muestra de células será aproximadamente la usada en los procedimientos de cultivo de células estándar. Por ejemplo, en algunas modalidades, el número de células en la muestra de células estará entre $1,0 \times 10^3$ células por cm^2 del frasco de cultivo y $1,0 \times 10^{10}$ células por cm^2 del frasco de cultivo. Este número de células equivaldrá a aproximadamente 12×10^6 por frasco de cultivo de tejidos de 80 cm^2 o 28×10^6 por frasco de cultivo de tejidos de 175 cm^2 .

En algunas modalidades, la muestra de células en la etapa (i) del método preferido se cultiva hasta que las células tengan aproximadamente una confluencia del 85 %. Los expertos en la técnica apreciarán que esto

podría incluir cambios regulares del primer medio base para mantener fresco el medio. En esta etapa, las células se procesan adicionalmente, por ejemplo, etapa (ii) del método de la invención, o se pasan.

5 Si las células se van a cosechar para la terapia celular, el primer medio de cultivo se elimina y se reemplaza con un segundo medio de cultivo. La etapa (ii) se realiza al menos 20 horas antes de cosechar las células para su uso en la terapia celular. Preferentemente, la etapa (ii) se realiza al menos 24 horas antes de cosechar las células para su uso en la terapia celular.

10 También se apreciará que no se puede permitir que las células permanezcan en contacto con el segundo medio de cultivo durante más de aproximadamente 48 horas, ya que las células comenzarán a volverse senescentes. En consecuencia, en algunas modalidades, la etapa (ii) se realiza entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 36 horas antes de cosechar las células para la terapia celular.

15 En algunos aspectos, las células en la etapa (ii) se cultivarán en presencia del segundo medio de cultivo durante 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 horas.

20 El segundo medio en la etapa (ii) comprende típicamente un medio base seleccionado del grupo que consiste en DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle (MEM), medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, M-199, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE o una de sus combinaciones. Preferentemente, el segundo medio base es DMEM sin rojo de fenol.

25 En algunas modalidades, el segundo medio base se suplementa con suero humano o albúmina sérica humana. Si bien la cantidad de suero humano o albúmina sérica humana usada en el segundo medio no está restringida, es decir, puede usarse cualquier cantidad de suero, en algunas modalidades, la cantidad de suero humano o albúmina sérica humana es aproximadamente el 2 %.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos de la presente invención pueden usarse en células, en un contexto alogénico o autólogo. En el contexto alogénico, el donante y el receptor pueden o no ser compatibles.

35 En algunas modalidades, las células tienen un fenotipo que comprende una expresión >90 % de CD73, >90 % de CD90, >90 % de CD105 y una expresión <5 % de CD34, <5 % de CD45, <5 % de CD14. En modalidades adicionales, las células tienen un fenotipo que comprende la expresión de CD54, CD61, CD89, CD140A y CD201. La expresión de CD54, CD61, CD89, CD140A y CD201 aumenta con relación a las células estromales mesenquimales humanas que se han cultivado mediante métodos distintos de los métodos de la invención como se describe en la presente descripción.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que las células pueden proporcionarse en una variedad de dispositivos de suministro. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células se suspenden en una jeringa, mientras que en otras las células se suspenden en un contenedor plegable. Preferentemente, las células se suspenden en un medio adecuado para la administración terapéutica a un paciente. Los expertos en la técnica apreciarán que una vez que se hayan producido las células expandidas de la presente invención, pueden almacenarse para su uso posterior. Además, las células expandidas pueden proporcionarse en forma de un kit que comprende una muestra de células y reactivos relevantes, tales como medios de cultivo, e instrucciones para su cultivo y uso.

50 En algunas modalidades, las células de la presente invención pueden incubarse en una monocapa o en un cultivo de 3 dimensiones. Para obtener cultivos de 3 dimensiones, los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse andamios adecuados. Los andamios adecuados incluyen Vitrogen™, una solución que contiene colágeno que gelifica para formar una matriz poblada de células, y los andamios de tejido conectivo de Hwang (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20040267362), Kladaki y otros (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20050177249) y Binette y otros (solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20040078077).

60 Las células de la presente invención también pueden aplicarse a cualquiera de una amplia variedad de superficies de contacto de dispositivos médicos. Las superficies de contacto incluyen, pero no se limitan a, superficies destinadas a entrar en contacto con sangre, células u otros fluidos corporales o tejidos de un animal, lo que incluye específicamente un humano. Las superficies de contacto adecuadas incluyen una o más superficies de dispositivos médicos que están destinadas a entrar en contacto con sangre u otros tejidos. Los dispositivos médicos incluyen espirales para aneurismas, vasos sanguíneos artificiales, corazones artificiales, válvulas artificiales, riñones artificiales, tendones y ligamentos artificiales, bolsas de sangre, oxigenadores de sangre, reemplazos óseos y cardiovasculares, prótesis óseas, ceras óseas, injertos cardiovasculares, dispositivos de reemplazo de cartílago, catéteres, microperlas, guías de crecimiento de nervios, implantes oftálmicos, implantes ortopédicos, prótesis, derivaciones, prótesis endovasculares,

revestimientos para heridas, dispositivos para la cicatrización de la herida y otros dispositivos médicos conocidos en la técnica.

La superficie de contacto puede incluir una malla, espiral, alambre, balón inflable o cualquier otra estructura que sea capaz de implantarse en una ubicación objetivo, lo que incluye ubicaciones intravasculares, ubicaciones intraluminales, ubicaciones dentro de tejido sólido y similares. El dispositivo implantable puede estar destinado a una implantación permanente o temporal. Tales dispositivos pueden suministrarse o incorporarse en catéteres intravasculares y otros catéteres médicos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Supervivencia actuarial, tiempo desde la primera infusión de las MSC.

Figura 2 a: Supervivencia actuarial por respuesta, casos agudos y tiempo desde la primera infusión de las MSC.

Figura 2 b: Supervivencia actuarial por respuesta, casos crónicos y tiempo desde la primera infusión de las MSC.

Figura 3: Media del Índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) durante el período de estudio.

Figura 4: Índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) antes y después del tratamiento con las MSC.

Descripción de las modalidades preferidas de la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos de producción ejemplificados particularmente, los que, por supuesto, pueden variar. La invención se limita solo por el alcance de las reivindicaciones anexas.

Además, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique de otra forma, técnicas inmunológicas, técnicas de biología celular y cultivo de tejidos y técnicas médicas convencionales dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se conocen bien por el experto en la técnica, y se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Coligan, Dunn, Ploegh, Speicher y Wingfield "Current Protocols in Protein Science" (1999) volumen I y II (John Wiley & Sons Inc.); y Bailey, J.E. y Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986); Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, por G. Morstyn y W. Sheridan, eds, Cambridge University Press, 1996; y Hematopoietic Stem Cell Therapy, E.D. Ball, J. Lister y P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

Debe destacarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas del singular "uno", "una" y "el/la" incluyen referencias del plural a menos que el contexto lo establezca claramente de cualquier otra manera. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células, y una referencia a "un animal" es una referencia a uno o más animales, etcétera. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los materiales y métodos similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o en la prueba de la presente invención, se describen los materiales y métodos preferidos.

En uno de los aspectos más amplios, la presente invención se refiere a un método para cultivar células estromales mesenquimales para la terapia.

Los términos "cultivar", "cultivo" y "cultivada" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren generalmente a técnicas de cultivo de células y tejidos estándar usadas para cultivar células *in vitro*. Las técnicas estándar incluyen técnicas de aislamiento para obtener células, clonación y selección de tipos de células específicos, destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa), separación basada en la capacidad de aglutinamiento celular diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución a contracorriente, electroforesis y clasificación de células activadas por fluorescencia. Para una revisión de las técnicas de selección clonal y separación celular, ver Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2da Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Cap. 11 y 12, pp. 137-168.

La frase "una muestra de células" o "células de la invención" se refiere al aislamiento o suministro de células para el cultivo y posterior terapia. Como los métodos de la invención pueden usarse en una célula de animal mamífero, la muestra de células estromales mesenquimales puede aislarse de una especie de animal mamífero seleccionada de un humano, un camélido, un equino, un canino o un felino.

El término "aislada" indica que la célula o población celular a la que se refiere no se encuentra dentro de su ambiente natural. La célula o población celular se ha separado sustancialmente del tejido circundante. En algunas modalidades, la célula o población celular está separada sustancialmente del tejido circundante si la muestra contiene al menos aproximadamente 75 %, en algunas modalidades, al menos aproximadamente 85 %, en algunas modalidades, al menos aproximadamente 90 %, y en algunas modalidades, al menos aproximadamente 95 % de células. En otras palabras, la muestra de células está separada sustancialmente del tejido circundante y la muestra contiene menos de aproximadamente 25 %, en algunas modalidades, menos de aproximadamente 15 %, y en algunas modalidades, menos de aproximadamente 5 % de materiales distintos de las células. Tales valores porcentuales se refieren al porcentaje por número de células. El término abarca las células que se han extraído del organismo del que se originaron, y que existen en cultivo. El término también abarca las células que se han extraído del organismo del que se originaron, y subsecuentemente son reinsertadas en un organismo. El organismo que contiene las células reinsertadas puede ser el mismo organismo del que se extrajeron las células, o puede ser un organismo diferente.

De acuerdo con las reivindicaciones, las células de la presente invención son células estromales mesenquimales (MSC). En algunas modalidades, las MSC no se producen a partir de material embrionario, sino que comprenden células estromales mesenquimales adultas.

La población celular de la invención también puede caracterizarse porque las células no expresan una selección particular de marcadores a un nivel detectable. Como se define en la presente descripción, se dice que estos marcadores son marcadores negativos.

En algunas modalidades, se considera que la población celular de la invención no expresa un marcador si al menos aproximadamente el 70 % de las células de la población celular aislada no debe mostrar expresión detectable del marcador. En otras modalidades, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % o el 100 % de las células de la población celular no deben mostrar ninguna expresión detectable del marcador. Nuevamente, la ausencia de expresión detectable puede probarse mediante un experimento de RT-PCR o mediante el uso de FACS.

Se considera que los marcadores negativos descritos anteriormente no se expresan por una población celular de la invención, si la expresión no puede detectarse razonablemente a un nivel de 30 ciclos de PCR, lo que corresponde a un nivel de expresión en la célula de menos de aproximadamente 100 copias por célula.

En una modalidad, la población celular también se caracteriza porque las células no expresan uno, dos o los tres de los marcadores CD14, CD34 y CD45 a un nivel detectable. Como se describió anteriormente, es posible que estos marcadores no se expresen a pesar de que persista una pequeña cantidad de expresión residual.

La población celular de la invención también puede caracterizarse porque las células expresan una selección particular de marcadores a un nivel detectable. Como se define en la presente descripción, se dice que estos marcadores son marcadores positivos.

En algunas modalidades, se considera que la población celular de la invención expresa un marcador si al menos aproximadamente el 70 % de las células de la población celular aislada muestran una expresión detectable del marcador. En otras modalidades, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % o el 100 % de las células de la población celular muestran expresión detectable del marcador. La expresión detectable puede demostrarse a través del uso de un experimento de RT-PCR o mediante el uso de FACS.

Se considera que los marcadores positivos descritos anteriormente se expresan por una población celular de la invención, si la expresión se detecta razonablemente a un nivel de 30 ciclos de PCR, lo que corresponde a un nivel de expresión en la célula de más de aproximadamente 100 copias por célula.

En una modalidad, la población celular también se caracteriza porque las células expresan uno, dos o los tres de los marcadores CD73, CD90 y CD105 a un nivel detectable.

El término CD73 incluye CD73 y cualquier ortólogo de este, lo que incluye, pero no se limita a, NT5E, 5'-nucleotidasa, ecto, RP11-321N4.1, E5NT, NT, NT5, NTE, eN, eNT, 5' nucleotidasa (CD73), 5' nucleotidasa, OTTHUMP00000040565, purina 5-prima-nucleotidasa, y ecto-5'-nucleotidasa.

El término CD90 incluye CD90 y cualquier ortólogo de este, lo que incluye, pero no se limita a, Thy-1, 5E10.

El término CD105 incluye CD105 y cualquier ortólogo de este, lo que incluye, pero no se limita a, ENG, endoglin, RP11-228B15.2, END, FLJ41744, HHT1, ORW y ORW1.

5

En algunas modalidades, las células tienen un fenotipo que comprende una expresión >90 % de CD73, >90 % de CD90, >90 % de CD105 y una expresión <5 % de CD34, <5 % de CD45, <5 % de CD14.

10

Aunque no forma parte de la presente invención, la muestra de células puede ser células mononucleares de médula ósea aisladas a partir de un aspirado de médula ósea. El aspirado de médula ósea puede recolectarse en una jeringa heparinizada a partir de la aguja de cosecha. Si el tiempo desde la recolección hasta el procesamiento es superior a 2 horas, la médula se almacena preferentemente refrigerada (2-8 °C) y el procesamiento comienza dentro de las 24 horas.

15

Las células mononucleares de médula ósea se separan mediante centrifugación en gradiente de densidad y se lavan en PBS antes de resuspenderse en un primer medio de cultivo celular y sembrarse en placas.

20

El número de células que se siembran en placas dependerá del tipo de célula y del tipo de frasco de cultivo. Sin embargo, el número de células estará típicamente entre $1,0 \times 10^3$ células por cm^2 del frasco de cultivo y $1,0 \times 10^{10}$ células por cm^2 del frasco de cultivo. En algunas modalidades, el número de células equivale aproximadamente a 12×10^6 por frasco de cultivo de tejidos de 80 cm^2 o 28×10^6 por frasco de cultivo de tejidos de 175 cm^2 .

25

La frase "primer medio de cultivo celular" se usa en la presente descripción para referirse al medio de cultivo estándar que permite que la muestra de células se metabolice, se expanda o prolifere en número de células hasta que el frasco de cultivo que contiene las células alcance un nivel de confluencia para ser cosechado.

30

Los términos "medio de cultivo" o "medio" o "medios" son reconocidos en la técnica y se refieren generalmente a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivas. El término "medio", como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea las células.

35

El "primer medio de cultivo celular" incluirá típicamente un primer medio base (por ejemplo, medio disponible comercialmente) tal como DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle (MEM), medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, M-199, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, el primer medio base es DMEM.

40

El "primer medio de cultivo celular" también incluirá típicamente un primer suero, un primer sustituto de suero, una primera fracción de suero o sus combinaciones. El término "primer suero" incluye fuentes de suero disponibles comercialmente tales como suero fetal de ternera (FCS) o suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS). Preferentemente, el primer medio base se suplementa con suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS).

45

El término "primer sustituto de suero" incluye lisado de plaquetas y productos comerciales tales como el sustituto de suero Ultrosor™ G (Pall Corporation, NY, EE.UU.); el sustituto de suero HIT™ que contiene albúmina sérica humana, insulina y transferrina en MDM de Iscove (Stemcell Technologies, BC, Canadá); el Serum Substitute Supplement™ (SSS™) que consiste en un 6 % de proteínas totales: contiene aproximadamente 84 % de albúmina sérica humana, 16 % de alfa y beta globulinas y < 1 % de gamma globulinas (Irvine Scientific, CA, EE.UU.) y el sustituto de proteínas séricas Quinns Advantage® (CooperSurgical Inc, CT, EE. UU.). Todos estos sustitutos de suero proporcionan el potencial osmótico, los factores de crecimiento y los nutrientes/proteínas correctos para permitir que la muestra de células se adhiera al frasco de cultivo y se expanda en número de células.

55

El término "primera fracción de suero" incluye componentes del suero tales como la albúmina sérica.

60

Una vez que se siembra en placas la primera muestra de células, las células se incuban en condiciones estándar de cultivo celular durante el tiempo suficiente para expandirse y alcanzar un nivel requerido de confluencia. Un conjunto típico de condiciones de cultivo celular es aproximadamente 37 °C, aproximadamente 5 % de CO_2 y aproximadamente 70 % de humedad.

65

La frase "tiempo suficiente" se refiere al período de tiempo necesario para que las células alcancen un "nivel de expansión deseado". Los expertos en la técnica apreciarán que el tiempo requerido para alcanzar un nivel de expansión deseado dependerá de ciertos factores tales como el tipo de célula, la densidad celular de siembra en placas inicial, el tipo de primer medio de cultivo celular y el número de células requerido para el uso final en la terapia. Sin embargo, de acuerdo con las reivindicaciones, las células se incuban durante entre

18 y 72 h, antes de que las células adherentes se laven con PBS y se reemplacen los medios para continuar el cultivo.

La frase "nivel de expansión deseado" implica típicamente la etapa de cultivar las células hasta que las células hayan alcanzado una confluencia del 70 al 90 % con cambios de medio cada 3-4 días. En algunas modalidades, las células pueden cultivarse en fábricas de células tales como las fábricas CellSTACK (Corning, EE.UU.). Las células se siembran en estas fábricas a densidades celulares típicas de aproximadamente 5000 células/cm². Como se describe *infra*, el número de células usadas en la terapia está entre aproximadamente 1×10^6 células/kg de peso corporal a aproximadamente 15×10^6 /kg de peso corporal. Por tanto, para una persona de 80 kg, se requerirán aproximadamente de 80×10^6 células a 1200×10^6 células en total. Por tanto, en algunas modalidades, la frase "nivel de expansión deseado" significa cultivar las células hasta que se haya producido un volumen de células deseado tal como de 80×10^6 células a 1200×10^6 células.

Una vez que las células han alcanzado el nivel de expansión deseado, las células pueden prepararse para la cosecha. La frase "antes de cosechar las células", como se usa en la presente, se refiere al reemplazo del "primer medio de cultivo celular" por un "segundo medio de cultivo celular". El período de tiempo al que se refiere el término "antes" es típicamente al menos 20 horas antes de que las células se cosechen para su uso en la terapia celular. Preferentemente, la etapa (ii) se realiza al menos 24 horas antes de cosechar las células para su uso en la terapia celular. Por tanto, típicamente el primer medio de cultivo celular se elimina y se reemplaza con un segundo medio de cultivo celular y después las células se incuban a aproximadamente 37 °C en una incubadora humidificada que contiene 5 % de CO₂ durante aproximadamente 24 h. También se apreciará que no se puede permitir que las células permanezcan en contacto con el segundo medio de cultivo celular durante más de aproximadamente 48 horas, ya que las células comenzarán a volverse senescentes.

Se apreciará que la frase "las células se cultivan durante un período de tiempo adicional" se refiere al mismo período de tiempo que abarca el término "antes".

La frase "segundo medio de cultivo celular", como se usa en la presente, se refiere a un medio de cultivo de tejidos que comprende un medio base seleccionado del grupo que consiste en DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle (MEM), medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio Dulbecco modificado de Iscove, M-199, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE o una de sus combinaciones. Preferentemente, el segundo medio base es DMEM sin rojo de fenol.

El "segundo medio de cultivo celular" también comprenderá "un segundo suero", "un segundo sustituto de suero", "una segunda fracción de suero" o sus combinaciones. Sin embargo, es fundamental que el segundo suero y/o la segunda fracción de suero tengan la misma especie de origen que las células en cultivo. Por ejemplo, si se cultivan células humanas, entonces el segundo medio comprenderá suero humano, sustituto de suero humano o albúmina sérica humana. Si se cultivan células equinas, entonces el segundo medio comprenderá suero de caballo, sustituto de suero de caballo o albúmina sérica de caballo. De manera similar, si se cultivan células caninas, entonces el segundo medio comprenderá suero canino, etcétera.

En algunas modalidades, el segundo medio base se suplementa con suero humano o albúmina sérica humana para su uso en el cultivo de células humanas. Si bien la cantidad de suero humano o albúmina sérica humana usada en el segundo medio no está restringida, es decir, puede usarse cualquier cantidad de suero, en algunas modalidades, la cantidad de suero humano o albúmina sérica humana es aproximadamente el 2 %.

Sin desear limitarse por ninguna teoría o hipótesis, los inventores creen que al cultivar células para la terapia en suero que no es "compatible" con la especie de origen, por ejemplo, suero humano para células humanas, suero canino para células caninas, etcétera, las células cultivadas producidas expresan marcadores de superficie que el sistema inmunitario del paciente reconoce como "extraños", lo que conduce a problemas de rechazo de tejidos y en última instancia al fracaso del tratamiento.

Sin embargo, cultivar células en suero de especies compatibles, por ejemplo, suero humano, durante demasiado tiempo es (i) costoso y (ii) produce suficientes células para la terapia muy lentamente. En consecuencia, es preferible cultivar células para la terapia en un medio de cultivo de tejidos "estándar" tal como DMEM y suero fetal de ternera y después eliminar el "primer medio de cultivo celular" para reemplazarlo con el "segundo medio de cultivo celular" de la presente invención, lo que permite la eliminación de los marcadores de superficie celular erróneos.

Teniendo en cuenta lo anterior, se debe señalar que después de la etapa de cultivar las células de la invención en el segundo medio de cultivo celular, las células tienen un "aumento en la expresión de uno o más marcadores de adhesión". El término "aumento en la expresión" se refiere a un aumento en la cantidad

de ARNm detectable que codifica una proteína de marcador de adhesión o la detección de la proteína de marcador de adhesión *per se*. El aumento es con relación al nivel de detección de ARNm y/o de la proteína para estos marcadores de adhesión en células que no se han cultivado en presencia del segundo medio de cultivo celular o, más específicamente, que se han cultivado en presencia de medio suplementado con suero fetal de ternera tal como el medio usado en el primer medio de cultivo celular. Las técnicas para medir el aumento de ARNm y/o de la proteína se conocen bien en el campo y se refieren *supra*.

Los términos "cosecha" y "cosechar" se usan en la presente descripción para referirse al proceso de recolectar las células expandidas para su uso en la terapia. Pueden usarse técnicas estándar para retirar las células de los frascos y de las fábricas de cultivo celular. Por ejemplo, es bien conocido que la tripsina puede usarse para retirar las células adherentes de los frascos de cultivo celular plásticos. Un método preferido implica la eliminación del segundo medio de cultivo celular de la fábrica de células mediante aspiración; el enjuague de las células con PBS; la adición de TrypLE™ Select (Life Technologies Inc, CA, EE.UU.); la incubación a 37 °C hasta que todas las células se hayan desprendido, generalmente dentro de los 30 min, pero menos de 1 hora. A continuación, las células se aíslan en los medios. Después, las células se centrifugan durante 5 minutos a 450 g (1500 rpm), se resuspenden en el medio de suspensión apropiado y se cuentan.

Las células en el medio de suspensión apropiado en el número de células apropiado para la terapia constituyen una composición para la terapia celular como se definió en la presente descripción.

El "medio de suspensión apropiado" dependerá de la terapia, la vía de administración, el tipo de célula y similares, pero típicamente el medio de suspensión es una solución isotónica adecuada para su uso intravenoso. Preferentemente, la solución isotónica comprende además aproximadamente 2 % de HSA.

El "número de células apropiado" depende nuevamente de la terapia que se esté llevando a cabo, la vía de administración, el tipo de célula y similares.

Los expertos en la técnica apreciarán que una vez que se hayan producido las células expandidas de la presente invención, estas pueden almacenarse para su uso posterior. Las técnicas para preparar las células de la invención para la criopreservación dependerán del uso final de las células. Si, por ejemplo, la criopreservación es para un subcultivo, entonces las células pueden cosecharse como se describió *supra* en medios apropiados, por ejemplo, DMEM suplementado con 10 % de HIFBS y 5 µg/ml de gentamicina, y un volumen igual de una solución de criopreservación de 80 % de medio de cultivo celular, por ejemplo, DMEM suplementado con 10 % de HIFBS y 5 µg/ml de gentamicina más 20 % de DMSO (dimetilsulfóxido). Alternativamente, si, por ejemplo, la criopreservación es para la administración futura al paciente, entonces las células pueden cosecharse en una solución isotónica que contiene preferentemente 2 % de HSA, después se centrifugan y se elimina el sobrenadante. Después, las células pueden resuspenderse en una solución isotónica y un volumen igual de una solución de criopreservación que comprende, por ejemplo, 40 % de solución isotónica, 40 % de HSA (solución al 20 %) y 20 % de DMSO. Las células se enfrían inicialmente hasta 2-8 °C y después se congelan a velocidad controlada hasta -160 °C.

El procedimiento para descongelar las células dependerá nuevamente del uso final. Por ejemplo, descongelar células que se van a cultivar implica típicamente una descongelación rápida en un baño de agua que contiene solución salina estéril, precalentada hasta 36-40 °C, hasta que se descongelan. A continuación, las células se lavan en PBS, se centrifugan a 450 g (1500 rpm) durante 5 min y se resuspenden en los medios para obtener la concentración celular requerida.

Para uso en pacientes, las células criopreservadas se descongelan rápidamente en un baño de agua que contiene solución salina estéril, precalentada hasta 36-40 °C, hasta que se descongelan. Después, las células se diluyen con una cantidad igual de una solución isotónica y se infunden dentro de las 5 horas posteriores a la descongelación.

Como se describió *supra*, los métodos de la presente invención pueden usarse en células alogénicas o autólogas. Por tanto, en algunas modalidades, el "donante" es un donante compatible, mientras que en otras modalidades el "donante" no es compatible. Por ejemplo, el donante puede tener una compatibilidad de tejido menor o igual al 50 % con el paciente, pero en otras circunstancias no habrá ninguna compatibilidad, es decir, un donante alogénico.

En algunas modalidades, las células de la presente invención se mezclan con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente descripción para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional con una relación de beneficio/riesgo razonable.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno, diluyente, excipiente o solvente líquido o sólido que encapsula el material, implicado en portar o transportar las células en cuestión desde un órgano o porción del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes del material que se administra y no dañino para el paciente.

El portador farmacéuticamente aceptable puede comprender un medio de cultivo celular que soporte la viabilidad de las células. Generalmente, el medio estará libre de suero para evitar provocar una respuesta inmunitaria en el receptor. El portador generalmente estará tamponado y/o libre de pirógenos.

Los portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, solventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos portadores y diluyentes se conoce bien en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de jeringa. En muchas modalidades, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se preserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos a través del uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal. Las soluciones que son composiciones celulares de la invención pueden prepararse mediante la incorporación de células como se describe en la presente descripción en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según se requiera, otros ingredientes enumerados anteriormente, que se han esterilizado mediante filtración.

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

Una vez que las células se han preparado como se describió en la presente descripción, entonces pueden usarse en la terapia para tratar a pacientes. Generalmente, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se usan en la presente descripción para referirse a la afectación a un individuo o animal, sus tejidos o células para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto es especialmente terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una afección y/o trastorno. "Tratar", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una afección y/o trastorno en un vertebrado, un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) inhibir la afección y/o trastorno, es decir, detener su desarrollo; o (b) aliviar o mejorar los síntomas de la afección y/o trastorno.

Los términos "afección" y/o "trastorno" se usan en la presente descripción indistintamente y se refieren a condiciones anormales que afectan a los animales, lo que incluye los humanos, que pueden tratarse mediante el uso de las células de la presente invención.

Como se describe a lo largo de la descripción, las células de la invención son particularmente adecuadas para terapias celulares, lo que incluye la inducción de la reparación/regeneración de tejidos *in vivo*. Aunque no forma parte de la presente invención, en la presente descripción se describe un método para tratar a un paciente, en donde el método comprende administrar las células de la invención al paciente en una cantidad apropiada.

Generalmente, las células de la invención o la progenie de estas se introducen en el cuerpo del paciente mediante infusión, inyección o implantación. Las células pueden infundirse o inyectarse o implantarse directamente en el tejido en el que se pretende que actúen. En la presente descripción se describe una jeringa que contiene las células de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En la presente descripción se describe además un catéter unido a una jeringa que contiene las células de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se analizó anteriormente, las células de la invención pueden usarse en la regeneración de tejidos. Para lograr esta función, las células pueden inyectarse o implantarse directamente en el tejido dañado, donde ejercen una acción, pueden multiplicarse y eventualmente pueden diferenciarse en el tipo de célula requerido, de acuerdo con su ubicación en el cuerpo.

Los tejidos que son susceptibles al tratamiento incluyen todos los tejidos dañados, lo que incluye

particularmente aquellos que pueden haber sido dañados por una enfermedad, lesión, trauma, una reacción autoinmune, o por una infección viral o bacteriana.

Como se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas, ya sea en solución, en microesferas o en micropartículas de una variedad de composiciones, pueden administrarse en la arteria que irriga el tejido o la parte del órgano dañado que necesita regeneración. Generalmente, dicha administración se realizará mediante el uso de un catéter. El catéter puede ser una de las grandes variedades de catéteres con balón usados para angioplastia y/o suministro de células o un catéter diseñado para el propósito específico de suministrar las células a una zona particular del cuerpo. Aunque las células exhiben un fuerte tropismo por ciertos tejidos (por ejemplo, miocardio), para ciertas indicaciones puede ser conveniente observar que la mayoría de las células administradas al paciente no atraviesan la red capilar y entran en la circulación sistémica. Para ciertos usos, las células pueden encapsularse en microesferas hechas de varios compuestos biodegradables diferentes, y con un diámetro de aproximadamente 15 µm. Este método puede permitir que las células administradas por vía intravascular permanezcan en el lugar del daño y no atraviesen la red capilar hacia la circulación sistémica en el primer pase. La retención en el lado arterial de la red capilar también puede facilitar su translocación hacia el espacio extravascular.

Como también se describe en la presente descripción, las células pueden inyectarse retrógradamente en el árbol vascular, ya sea a través de una vena para suministrarlas a todo el cuerpo o localmente en la vena particular que drena en el tejido o parte del cuerpo al que se dirigen las células.

Una opción alternativa para el tratamiento del miocardio es un transcatéter para inyección transendocárdica, con o sin mapeo eléctrico con un sistema como el sistema Noga o cualquier sistema de inyección similar.

Como también se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas pueden implantarse en el tejido dañado adheridas a un implante biocompatible. Las células pueden estar adheridas al implante biocompatible *in vitro*, antes de la implantación en el paciente. Como quedará claro para un experto en la técnica, puede usarse cualquiera de una serie de adherentes para adherir las células al implante, antes de la implantación. Solo a manera de ejemplo, dichos adherentes pueden incluir fibrina, uno o más miembros de la familia de las integrinas, uno o más miembros de la familia de las cadherinas, uno o más miembros de la familia de las selectinas, una o más moléculas de adhesión celular (CAM), una o más de la familia de las inmunoglobulinas y uno o más adherentes artificiales. Para un experto en la técnica, quedará claro que puede usarse cualquier combinación de uno o más adherentes.

Como también se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas pueden incluirse en una matriz, antes de la implantación de la matriz en el paciente. Generalmente, la matriz se implantará en el tejido dañado del paciente. Ejemplos de matrices incluyen matrices basadas en colágeno, matrices basadas en fibrina, matrices basadas en laminina, matrices basadas en fibronectina y matrices artificiales.

Como también se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas pueden implantarse o inyectarse en el paciente junto con un componente formador de matriz. Esto puede permitir que las células formen una matriz después de la inyección o implantación, lo que asegura que las células permanezcan en la ubicación apropiada dentro del paciente. Los ejemplos de componentes formadores de matriz incluyen pegamento de fibrina de alquilo líquido, monómeros de cianoacrilato, plastificantes, polisacáridos tales como dextrano, oligómeros que contienen óxido de etileno, copolímeros de bloque tales como poloxámero y Pluronic, surfactantes no iónicos tales como Tween y Triton®8, y componentes formadores de matrices artificiales. Para un experto en la técnica, quedará claro que puede usarse cualquier combinación de uno o más componentes formadores de matriz.

Como también se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas pueden estar contenidas dentro de una microesfera. Las células pueden estar encapsuladas dentro del centro de la microesfera. También dentro de esta modalidad, las células pueden incluirse en el material de matriz de la microesfera. El material de matriz puede incluir cualquier polímero biodegradable adecuado, lo que incluye, pero no se limita a, alginatos, polietilenglicol (PLGA) y poliuretanos.

Como también se describe en la presente descripción, las células de la invención o la progenie de estas pueden adherirse a un dispositivo médico destinado a la implantación. Los ejemplos de dichos dispositivos médicos incluyen prótesis endovasculares, clavos de fijación, puntos, divisiones, marcapasos, prótesis de articulaciones, piel artificial y varillas. Para un experto en la técnica, quedará claro que las células pueden adherirse al dispositivo médico mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, las células pueden adherirse al dispositivo médico mediante el uso de fibrina, uno o más miembros de la familia de las integrinas, uno o más miembros de la familia de las cadherinas, uno o más miembros de la familia de las selectinas, una o más moléculas de adhesión celular (CAM), uno o más miembros de la familia de las inmunoglobulinas y uno o más adherentes artificiales. Para un experto en la técnica, quedará claro que puede usarse cualquier combinación de uno o más adherentes.

Aunque no forma parte de la presente invención, las células de la invención pueden administrarse en la circulación periférica y a través de su tropismo por el tejido de origen, puede esperarse que las células se dirijan hacia el órgano/tejido que se va a tratar.

Como se describió anteriormente, para su uso en medicina, las células se suministrarán al paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. El número de células que se suministrarán *in vivo* o *ex vivo* puede basarse en una serie de parámetros, lo que incluye: el peso corporal del paciente, la gravedad del daño tisular y el número de células que sobreviven dentro del sujeto. Un número típico de células puede ser alrededor de 10^6 a 10^9 células. Puede ser necesario repetir la infusión, inyección o implantación de las células durante hasta varios años para alcanzar la masa total acumulativa necesaria y/o reemplazar las células que están muriendo. Generalmente, el número total de células suministradas al paciente en un único régimen de tratamiento será mayor que aproximadamente 1×10^6 . Sin embargo, el número total de células suministradas puede ser superior a 1×10^{10} . El paciente o receptor recibirá normalmente al menos una dosis de células. Preferentemente, el paciente o receptor recibirá 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más dosis.

Las células pueden darse como una dosis única, dosis múltiples durante un período de tiempo definido, o hasta e incluyendo una administración de mantenimiento crónica de rutina. Las dosis de células típicamente se separarán. Por ejemplo, las dosis pueden separarse de 1 a 2 días o semanal o mensualmente. En algunas modalidades, las dosis son semanales durante 4 semanas.

Aunque no forma parte de la presente invención, las células aisladas de la invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para usar en la regeneración de tejidos o terapia celular, lo que incluye, pero no se limita a, la enfermedad de Crohn, la enfermedad de injerto contra huésped, la regeneración del hígado, de ciertas áreas del sistema nervioso, tales como aquellas asociadas con la enfermedad de Parkinson, y el páncreas. Tal regeneración puede permitir el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la diabetes tipo II, las úlceras de la piel crónicas y los trastornos autoinmunes. Las células de la presente invención también pueden usarse para tratar el glioma primario de alto grado o tumores cerebrales recurrentes de bajo grado tales como glioma, ependimoma, meduloblastoma o tumores teratogénicos, enfermedad arterial periférica grave, reparación de tendones, mieloma múltiple, leucemia, daño de la córnea, esclerodermia, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (SLE), vasculitis, enfermedad de Behçet, osteoartritis, reparación de cartílagos y artritis reumatoide.

Aunque no forma parte de la presente invención, las células de la presente invención también pueden aplicarse a cualquiera de una amplia variedad de superficies de contacto de dispositivos médicos. Las superficies de contacto incluyen, pero no se limitan a, superficies destinadas a entrar en contacto con sangre, células u otros fluidos corporales o tejidos de un animal, lo que incluye específicamente un humano. Las superficies de contacto adecuadas incluyen una o más superficies de dispositivos médicos que están destinadas a entrar en contacto con sangre u otros tejidos. Los dispositivos médicos incluyen espirales para aneurismas, vasos sanguíneos artificiales, corazones artificiales, válvulas artificiales, riñones artificiales, tendones y ligamentos artificiales, bolsas de sangre, oxigenadores de sangre, reemplazos óseos y cardiovasculares, prótesis óseas, ceras óseas, injertos cardiovasculares, dispositivos de reemplazo de cartílagos, catéteres, lentes de contacto, contenedores para cultivo y regeneración de células y tejidos, partículas de embolización, sistemas de filtración, injertos, canales guía, catéteres permanentes, instrumentos de laboratorio, microperlas, guías de crecimiento de nervios, implantes oftálmicos, implantes ortopédicos, cables de marcapasos, sondas, prótesis, derivaciones, prótesis endovasculares, soportes para péptidos, instrumentos quirúrgicos, suturas, jeringas, reemplazos del tracto urinario, coberturas para heridas, apósitos para heridas, dispositivos para la cicatrización de la herida y otros dispositivos médicos conocidos en la técnica.

Otros ejemplos de dispositivos médicos que se beneficiarían de la aplicación de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica de los procedimientos médicos y quirúrgicos y por lo tanto están contemplados en la presente invención. La superficie de contacto puede incluir una malla, espiral, alambre, balón inflable o cualquier otra estructura que sea capaz de implantarse en una ubicación objetivo, lo que incluye ubicaciones intravasculares, ubicaciones intraluminales, ubicaciones dentro de tejido sólido y similares. El dispositivo implantable puede estar destinado a una implantación permanente o temporal. Tales dispositivos pueden suministrarse o incorporarse en catéteres intravasculares y otros catéteres médicos.

Aunque no forma parte de la presente invención, las células expandidas pueden proporcionarse en forma de un kit, sistema o paquete de procedimiento, que contiene productos terapéuticos empaquetados individualmente y pueden incluir combinaciones de medicamentos, dispositivos médicos y productos biológicos.

Por "que comprende" se entiende que incluye, pero no se limita a, todo lo que sigue a la palabra que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes. Por "que

consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, todo lo que sigue a la frase "que consiste en". Por tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquiera de los elementos enumerados después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren o contribuyen con la actividad o acción especificada en la descripción de los elementos enumerados. Por tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes en dependencia de si afectan o no la actividad o acción de los elementos enumerados.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de solo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Debe entenderse, sin embargo, que los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no debe tomarse de ninguna manera como una restricción en la generalidad de la invención descrita anteriormente.

Ejemplo 1 Proceso de fabricación de las células estromales mesenquimales (MSC) de la invención

Las células mononucleares de médula ósea se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad y las células lavadas se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen, Australia) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (SABC Biosciences, Australia) (un ejemplo representativo del "primer medio de cultivo celular" de la presente invención como se describió en la presente descripción) y se sembraron en placas a una densidad de 160 000 células por cm².

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía 5 % de CO₂ durante 18-72 h, antes de que las células adherentes se lavaran con PBS (DKSH, Australia) y se reemplazaran los primeros medios frescos para continuar el cultivo. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80-90 % con cambios de medios cada 3-4 días y después se pasaron mediante el uso de TrypLE-Select (Invitrogen, Australia) y se resembraron a una densidad de 5000 células/cm² en fábricas CellSTACK (Corning, EE.UU.). Después de la expansión, generalmente en el pase 2 o 3, el medio que comprendía FBS se eliminó y se reemplazó con medio Eagle modificado de Dulbecco sin rojo de fenol (Invitrogen, Australia) suplementado con albúmina sérica humana (HSA) al 2 % (ARCBs) (un ejemplo representativo de un "segundo medio de cultivo celular" de la presente invención como se describió en la presente descripción). A continuación, las MSC producidas mediante este método se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada que contenía 5 % de CO₂ durante 24 h. Después, las células se cosecharon y se administraron o se criopreservaron en 10 % de dimetilsulfóxido (WAK-Chemie, Alemania), 50 % de Plasma-Lyte (Baxter Health Care, Sidney, Australia), 20 % de solución de cloruro de sodio y 20 % de albúmina sérica humana y se almacenaron a -196 °C. La expansión celular se limitó a 5 pases y se llevó a cabo un análisis citogenético en el pase final. Las células se prepararon para permitir dosis de 1 - 10 × 10⁶ células/kg de peso corporal del paciente.

Las MSC se consideraron disponibles para su uso clínico siempre y cuando cumplieran con los siguientes criterios de liberación: las pruebas de microcontaminación del producto final mediante cultivo aerobio y anaerobio (Bactec plus aerobe/F y Bactec plus anaerobe/F, BD) fueron negativas, la viabilidad celular mediante exclusión por azul de tripano fue mayor que el 70 % y hubo expresión del inmunofenotipo característico de MSC (expresión de CD73, CD90 y CD105 y ausencia de expresión de CD45, CD34 y CD14) según se analizó mediante citometría de flujo en una máquina FACS Canto, mediante el uso del software FACS Diva.

Ejemplo 2 Expresión en la superficie celular

El fenotipado de la superficie celular se realizó mediante el uso de paneles de tamizaje BD Lyoplate™ de Becton Dickinson, que son los primeros sistemas integrales disponibles para la elaboración de perfiles eficientes de cientos de marcadores de superficie celular humanos y murinos mediante citometría de flujo o análisis de imágenes. Los paneles se usaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las células de la invención se produjeron mediante el uso de la metodología descrita en el Ejemplo 1 y como comparador se cultivaron otras muestras de MSC durante el mismo período de tiempo que en el Ejemplo 1, pero sin la etapa de cultivo final en presencia de albúmina sérica humana. Después, se examinó la expresión de 242 marcadores mediante citometría de flujo de alto rendimiento y encontramos que varios marcadores de la superficie celular se expresaban diferenciadamente. Por ejemplo, CD54, CD61, CD89, CD140A y CD201 tuvieron un aumento de la expresión en células cultivadas en medios que contenían albúmina sérica humana en comparación con medios que contenían suero fetal de ternera. Estos marcadores son principalmente marcadores de adhesión.

Ejemplo 3 Uso de células estromales mesenquimales de la invención en la terapia para la enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica refractaria a esteroides

En las últimas dos décadas se han logrado avances significativos en la comprensión de la biología, y en la prevención y el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), lo que condujo a la introducción de agentes de segunda línea tales como los productos biológicos anti-factor de necrosis

antitumoral (TNF) y anti-CD25. Sin embargo, el pronóstico de la GVHD aguda refractaria a esteroides sigue siendo deficiente, con alrededor del 20 % de supervivencia a largo plazo (Deeg, (2007), Blood, 109(10): 4119-26). La incidencia de GVHD aguda de grados II-IV es aproximadamente del 50 % después del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (HSCT). El tratamiento estándar es con corticoesteroides en dosis altas, generalmente metilprednisolona 2 mg/kg IV o el equivalente oral, que induce una respuesta completa duradera en alrededor del 30-40 % de los pacientes (MacMillan y otros, (2002), Biol Blood Marrow Transplant; 8(7): 387-94). En la GVHD crónica refractaria a esteroides (CGVHD), la supervivencia a largo plazo disminuye y la morbilidad incapacitante es común.

Investigamos si las MSC producidas mediante el método del Ejemplo 1 eran capaces de tratar la enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica refractaria a esteroides.

Entre marzo de 2007 y julio de 2010, los pacientes con GVHD crónica y aguda que firmaron el consentimiento informado fueron elegibles para recibir MSC en un ensayo de seguridad de fase 1 en una sola institución. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital Royal Perth y recibió una Notificación de Ensayos Clínicos (CTN) por parte de la autoridad reguladora australiana, la Therapeutics Goods Administration (TGA). El ensayo se registró en el Registro de Ensayos Clínicos de Australia y Nueva Zelanda (ANZCTR12610000068066).

Todos los pacientes con trasplante alogénico recibieron profilaxis contra AGVHD con un inhibidor de la calcineurina y 4 dosis de metotrexato. El acondicionamiento previo al trasplante fue mieloablativo en 14 pacientes y no mieloablativo en 7 pacientes. La fuente de células madre hematopoyéticas fue células de sangre periférica movilizadas en todos los pacientes.

Los pacientes con AGVHD de 18 años de edad o más fueron elegibles para el estudio si los grados II-IV de AGVHD no habían respondido o progresado después de 7 días de tratamiento con 2 mg/kg de metilprednisolona intravenosa o 2,5 mg/kg de prednisolona oral. La AGVHD se evaluó mediante la calificación de consenso (Przepiorka y otros (1995), Bone Marrow Transplant; 15(6): 825-8). Todos los pacientes continuaron con la terapia con esteroides y un inhibidor de la calcineurina y todos comenzaron una terapia concomitante de segunda línea con 25 mg de etanercept por vía subcutánea dos veces por semana. El etanercept es un receptor 2 del TNF α dimérico soluble, que compite por la unión con el TNF y lo inactiva. Se requirió un diagnóstico de AGVHD confirmado por biopsia para ingresar al ensayo. Se excluyeron los pacientes con un estado funcional deficiente, que no se esperaba que sobrevivieran 7 días.

Los pacientes con GVHD crónica tenían una enfermedad extensa a pesar de 2,5 mg/kg de prednisolona y un inhibidor de la calcineurina y generalmente recibían micofenolato, pero no estaban obligados a hacerlo como parte del protocolo. Se clasificaron de acuerdo con los Criterios de Consenso del NIH, donde los principales órganos objetivo tenían una puntuación de 2 o más (Filipovich y otros, (2005), Biol. Blood Marrow Transplant; 11(12): 945-56).

El criterio de valoración principal del ensayo fue la seguridad, y los criterios de valoración secundarios fueron una mejor respuesta y la supervivencia general. Para la AGVHD, la respuesta completa fue la pérdida de todos los síntomas y signos de la AGVHD, y la respuesta parcial fue al menos una mejora de un grado o más. Para la CGVHD, la respuesta completa fue como para la AGVHD y la respuesta parcial fue una mejora en la puntuación de consenso del NIH de al menos uno (Filipovich y otros, (2005), *supra*).

Los donantes debían tener menos de 60 años de edad, no tener comorbilidades médicas y firmar un consentimiento informado. También debían tener marcadores negativos de enfermedades infecciosas como lo exige la TGA para la donación de sangre y tejidos.

Se inscribieron diecinueve pacientes entre enero de 2007 y junio de 2010, 12 con AGVHD y 7 con CGVHD. Las características y la respuesta de los pacientes se muestran en la Tabla 1 para la AGVHD y en la Tabla 2 para la CGVHD.

Tabla 1 Características y respuesta de los sujetos con AGVHD

Paciente, Género, Edad	Donante	Acondicionamiento	Diagnóstico primario	Tiempo transcurrido desde el alograft en la primera infusión (meses)	Fuente de las MSC	Signos de AGVHD	Etapas de la AGVHD (grado)	Núm. de infusiones	Respuesta por órgano (y etapa cuando hubo PR)	Resultado
UPN 1, M, 21	MUD	Cy/TBI (M)	CALL, Recaida	5	Hermano con HLA no compatible	Hepática Piel Mucositis	1 3 4 (III)	19	CR hepática CR piel CR mucositis	CR, sin inmunosupresión
UPN 4, F, 23	MUD	Bu/Mel (M)	MDS	6	Un 3º	Piel Mucositis oral	3 4 (III)	5	CR piel CR mucositis	CR
UPN 6, M, 53	MUD	Flu/TBI (M)	CLL	1	Un 3º	Piel Intestino	4 3 (IV)	8	CR piel PR(1) intestino	Falleció por sepsis viral y fungica
UPN 8, F, 29	MUD	Flu/Mel (M)	AML	1	Un 3º	Piel	3 (III)	2	CR piel	CR
UPN 9, M, 56	MUD	Flu/Mel (NM)	NHL	5	Un 3º	Piel Intestino	2 2 (II)	2	CR piel CR intestino	CR
UPN 11, M, 58	MUD	Flu/Mel (NM)	AML	10	Un 3º	Piel Intestino	3 3 (III)	2	PR(1) piel PR(1) intestino	Falleció por sepsis intestinal
UPN 12, M, 61	MUD	Bu/Flu (NM)	RAEB2T	4	Un 3º	Piel Intestino	3 3 (III)	2	CR piel PR(1) intestino	Falleció por sepsis intestinal
UPN 13, F, 47	Hermano	Bu/Mel (M)	Secundaria AML	1	Un 3º	Piel Intestino	3 3 (III)	2	CR piel CR intestino	CR
UPN 15, M, 25	MUD	Bu/Mel (M)	CML BC	4	Un 3º	Hepática Piel Intestino	1 4 3 (IV)	2	CR hepática CR piel	CR
UPN 16, F, 47	Hermano	Cy/TBI (M)	CLL	6	Hermano compatible	Intestino Piel	2 4 (IV)	2	CR intestino CR piel	CR
UPN 17, M, 50	MUD	Bu/Mel (M)	PRV a MF	4	Un 3º	Intestino Hígado	3 2 (III)	2	PR(1) intestino NR hígado	Falleció por accidente cerebrovascular hemorrágico
UPN 18, M, 52	MUD	Flu/Mel (NM)	NHL	1	Un 3º	Piel Mucositis	4 4 (IV)	2	NR Piel NR mucositis	NR Falleció por sepsis

MUD: donante no emparentado compatible, Hermano: hermano compatible, Cy: ciclofosfamida, TBI: irradiación corporal total, Bu: busulfán, Mel: melfalan, Flu: fludarabina, M: mieloablativo, NM: no mieloablativo, CALL: leucemia linfoblástica aguda común, MDS: mielodisplasia, CLL: leucemia linfocítica crónica, AML: leucemia mieloide aguda, NHL: linfoma no Hodgkin, RAEBT: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, CML BC: leucemia mieloide crónica en crisis blástica, PRV: policitemia rubra vera, MF: mielofibrosis, CR: respuesta completa, PR: respuesta parcial

Tabla 2 Características y respuesta de los sujetos con CGVHD

Paciente, Género, Edad	Donante	Acondicionamiento	Diagnóstico primario	Tiempo transcurrido desde el aoinjerto en la primera infusión (meses)	Fuente de las MSC	Signos de CGVHD y puntuación	Núm. de infusiones	Respuesta por órgano (puntuación alcanzada cuando hubo PR)	Resultado
UPN 2, M, 51	Hermano	Bu/Mel (M)	AML	63	Hermano	O.B 3 KCS 2	8	NR O.B PR(1) KCS	Infecciones respiratorias recurrentes y muerte
UPN 3, M, 50	Hermano	Cy/TBI (M)	Ph + ALL	85	Hermano	O.B 3 KCS 2	8	NR O.B PR(1) KCS	Muerte por insuficiencia respiratoria
UPN 5, F, 36	MUD	Bu/Mel (M)	AML	89	Hermano	Piel 2	7	CR piel	CR
UPN 7, M, 31	MUD	TBI/Mel (M)	AML	18	Un 3º	Mucositis oral 3	8	CR	CR
UPN 10, M, 34	MUD	Bu/Mel (M)	ALL	14	Un 3º	Mucositis oral 3	3	PR(2) mucositis	Falleció por leucemia progresiva
UPN 14, F, 53	MUD	Flu/Mel (NM)	CML BC	27	Hijo haploide	O.B 2 Piel 2	2	NR O.B PR(1) piel	Falleció por infección respiratoria, insuficiencia respiratoria
UPN 19, M, 48	Hermano	Bu/Mel (M))	AML	20	Un 3º	Hepático 3	11	NR hígado	NR Falleció por insuficiencia hepática

MUD: donante no emparentado compatible, Hermano: donante hermano compatible, Haploide: haploidéntico, Bu: busulfán, Mel: melfalán, Cy: ciclofosfamida, TBI: irradiación corporal total, AML: leucemia mieloide aguda, Ph + ALL: leucemia linfoblástica aguda Filadelfia positiva, CML BC: leucemia mieloide crónica en crisis blástica, OB: bronquiolitis obliterante, KCS: queratoconjuntivitis seca, CR: respuesta completa, PR: respuesta parcial

Todos los pacientes tenían una neoplasia maligna hematológica. Los pacientes que recibieron un trasplante de un donante no emparentado compatible representaron 10 de los 12 con AGVHD y 2 de 7 con CGVHD.

Inicialmente, los pacientes recibieron 8 infusiones de MSC dos veces por semana durante 4 semanas por vía intravenosa, ya sea como pacientes hospitalizados en el caso de AGVHD o en un centro de día para los pacientes con CGVHD, y se monitorearon para detectar reacciones relacionadas con la infusión. Subsecuentemente, tras la publicación de un ensayo aleatorizado que comparó dos dosis de MSC para la AGVHD (Kebriaei y otros, 2009), Biol Blood Marrow Transplant.; 15(7): 804-11), se realizó una enmienda del ensayo a dos infusiones a intervalos semanales y nueve pacientes recibieron infusiones sobre esta base. Los pacientes que lograron pero no mantuvieron una respuesta completa fueron elegibles para un nuevo tratamiento con dos infusiones a intervalos semanales. La respuesta completa fue la pérdida de todos los signos de GVHD, la respuesta parcial fue una mejora de un grado, la enfermedad estable fue sin cambio en los síntomas o signos de GVHD, y la progresión fue un deterioro de un grado o más.

La seguridad se evaluó mediante la observación del paciente durante 4 h después de cada infusión, monitoreando los signos vitales para detectar reacciones a la infusión. En visitas subsecuentes para la infusión también se les preguntó a los pacientes sobre los síntomas experimentados durante el intervalo posterior a la infusión anterior y se les monitoreó para detectar eventos adversos en un seguimiento regular continuo.

Dado que se trataba de un estudio de fase I, restringimos los métodos estadísticos a métodos descriptivos que indican la experiencia general de los pacientes estratificados en las categorías aguda y crónica. La supervivencia se describió como el tiempo transcurrido a partir de la primera infusión de MSC. Se usó el método de Kaplan-Meier para estimar los tiempos de supervivencia por separado para los casos agudos y crónicos. Se usó la prueba no paramétrica de rangos logarítmicos para examinar las diferencias en la supervivencia entre grupos y para examinar las tendencias en los patrones de supervivencia para grupos ordenados.

Las MSC para este estudio se derivaron de un aspirado de médula ósea de un total de 16 miembros de familia haploidénticos o donantes con HLA no compatible, emparentados o no emparentados. Las MSC se fabricaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

Se administraron un total de 109 infusiones a los 19 pacientes con una mediana de 2 infusiones por paciente. Dos pacientes requirieron infusiones adicionales por la recaída de AGVHD, un paciente tuvo un episodio de reinfusión y el segundo recibió 7 infusiones durante 3 años. Seis pacientes con CGVHD recibieron 2 infusiones en un episodio de tratamiento y un paciente con CGVHD tuvo más de un episodio de tratamiento, recibiendo un total de 11 infusiones. Aparte de anomalías leves en el gusto debido al crioprotector dimetilsulfóxido observadas en varios pacientes, las infusiones fueron bien toleradas sin toxicidades agudas relacionadas con la infusión y no se observaron toxicidades subsecuentes atribuibles a las infusiones de MSC.

La respuesta por órgano implicado y la respuesta general se muestran en la Tabla 1 para la AGVHD y en la Tabla 2 para la CGVHD. La tasa de respuesta general para la AGVHD fue completa en 7, parcial en 4 y sin respuesta en un paciente. Todos los pacientes que no tuvieron una respuesta completa fallecieron: 5 por infección oportunista y uno por accidente cerebrovascular hemorrágico. De los siete pacientes que lograron una respuesta completa, 6 están vivos y uno falleció por sepsis bacteriana.

Dos pacientes con CGVHD lograron una respuesta completa, mientras que 2 lograron respuestas parciales y 3 no tuvieron respuesta. Hubo 5 muertes en este grupo, 3 por bronquiolitis obliterante progresiva asociada con infecciones respiratorias, una por insuficiencia hepática debida a CGVHD y una por recaída de leucemia linfoblástica aguda. La supervivencia actuarial para ambos grupos se muestra en la Figura 1, con una supervivencia a 3 años del 55 % para el grupo agudo y una mediana de supervivencia para la CGVHD de 8 meses. En la AGVHD, la respuesta completa fue importante para la supervivencia. La prueba de rangos logarítmicos mostró que la respuesta era un predictor estadísticamente significativo de supervivencia para los pacientes con GVHD aguda ($\chi^2 = 11,3$, $p = 0,0008$) (Figura 2a), pero no para los casos crónicos ($\chi^2 = 2,79$, $p = 0,100$) (Figura 2b).

Este estudio informa la infusión segura de 109 dosis de MSC derivadas de donantes cultivadas y almacenadas en condiciones GMP. La ausencia de toxicidad temprana y tardía relacionada con la infusión refleja la calidad del producto fabricado, así como también el estado privilegiado de inmunidad innata de las MSC. En resumen, no identificamos problemas de seguridad, ni tempranos ni tardíos, en nuestro grupo de 19 pacientes.

Ejemplo 4 Uso de células estromales mesenquimales alogénicas de la invención en la terapia para la enfermedad de Crohn luminal refractaria a la terapia con productos biológicos

A pesar de la aparición de la terapia con productos biológicos para la enfermedad de Crohn (CD), aproximadamente una cuarta parte de los pacientes todavía necesitan una cirugía abdominal mayor dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico. Para evitar la cirugía, la terapia celular mediante trasplante de células madre de médula ósea o de sangre periférica, ya sea alogénicas o autólogas, se ha usado con éxito en un pequeño número de pacientes, pero requiere de terapia mieloablativa o movilización de células madre hematopoyéticas previa (Hommes y otros (2011), J Crohns Colitis; 5: 543-549).

Por el contrario, las MSC son células madre adultas multipotentes que se considera que carecen de inmunogenicidad y por lo tanto, escapan al reconocimiento inmunitario; tienen un nivel bajo de expresión de HLA clase I, carecen de antígeno HLA clase II y no expresan moléculas coestimuladoras.

En consecuencia, en la administración alogénica, no se requiere compatibilidad entre donante y receptor, ni acondicionamiento quimioterapéutico de la médula (Le Blanc y otros (2003), Exp Hematol; 31: 890-896).

Como demostramos *supra* en el Ejemplo 2, las MSC de nuestra invención trataron con éxito la GVHD refractaria a esteroides. Nuestra hipótesis es que nuestras MCS también podrían usarse para tratar la enfermedad de Crohn luminal refractaria a otras terapias con productos biológicos.

Nuestro estudio multicéntrico, abierto, de fase 2 incluyó a 16 pacientes (21-55 años de edad; 6 hombres) con CD luminal activa, refractaria a infliximab o adalimumab, confirmada endoscópicamente (índice de actividad de CD [CDAI]>250). Los sujetos recibieron infusiones intravenosas de MSC alogénicas como se prepararon en el Ejemplo 1 (2×10^6 células/kg de peso corporal) semanalmente durante 4 semanas. El criterio de valoración principal fue la respuesta clínica (disminución del CDAI > 100 puntos) 42 días después de la primera administración de las MSC; los criterios de valoración secundarios fueron remisión clínica (CDAI < 150), mejora endoscópica (un valor del índice de gravedad endoscópica de la CD [CDEIS] < 3 o una disminución de > 5), calidad de vida, nivel de proteína C reactiva, y seguridad.

Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: CD del colon o del intestino delgado (basada en endoscopia e histología); CDAI > 250; enfermedad endoscópicamente activa; enfermedad refractaria a la inducción con infliximab o adalimumab, o pérdida de respuesta a ambos, o efectos secundarios a cualquiera o ambos de estos fármacos que impiden su uso posterior. El fracaso en inducir la remisión se definió como el fracaso de la remisión clínica cuatro semanas después de un mínimo de tres dosis de infliximab (5 mg/kg) a las 0, 2 y 6 semanas; o tres dosis de adalimumab (160 mg, semana 0; 80 mg, semana 2; 40 mg, semana 4). Se aplicaron los siguientes criterios de exclusión: enfermedad estenosante crónica sin inflamación; enterocolitis bacteriana coexistente o infección por citomegalovirus (CMV); neoplasia maligna anterior; embarazo o no dispuesta a usar métodos anticonceptivos durante la terapia; lactancia; estoma (CDAI no medible); o sepsis activa, lo que incluye sepsis perianal o enfermedad perforante. Se aplicó lo siguiente con respecto a la terapia farmacológica concomitante: último producto biológico (infliximab o adalimumab) cuatro o más semanas antes; y entre $t = -14$ días y el día 42, dosis estables de corticoesteroide (dentro de una variación de 10 mg de prednisolona), inmunomodulador (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato) o antidiarreico.

Entre los 15 pacientes que completaron el estudio, la puntuación CDAI media se redujo de 370 (mediana, 327; intervalo, 256-603) a 203 (mediana, 129) en el día 42 ($P < .0001$). Las puntuaciones medias de CDAI disminuyeron después de cada infusión de MSC (370 antes de la administración, 269 el día 7, 240 el día 14, 209 el día 21, 182 el día 28, y 203 el día 42). La Figura 3 muestra la media del índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) durante el período de estudio. Doce pacientes tuvieron una respuesta clínica (80 %; intervalo de confianza del 95 %, 72 %-88 %; reducción media del CDAI, 211; intervalo 102-367), 8 tuvieron remisión clínica (53 %; intervalo, 43 %-64 %; CDAI medio en el día 42, 94; intervalo 44-130). La Figura 4 muestra el índice de actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI) antes y después del tratamiento con las MSC. Siete pacientes tuvieron mejora endoscópica (47 %), para quienes las puntuaciones medias del CDEIS disminuyeron de 21,5 (intervalo, 3,3-33) a 11,0 (intervalo, 0,3-18,5). Un paciente tuvo un evento adverso grave (2 lesiones asociadas a displasia), pero probablemente no provocado por las MSC.

La Tabla 3 muestra los datos demográficos del estudio, mientras que las Tablas 4 y 5 muestran las evaluaciones de los resultados.

Número de paciente	Edad	Género	Distribución de la enfermedad	CDAI ingreso	Terapia con producto biológico/ inmunomodulador anterior	Cirugía anterior	Anti-TNF antes de las MSC (semanas antes de la última dosis) *Fracaso primario	Terapia farmacológica concomitante durante el estudio#	Dosis total de MSC
1	25	F	Colitis	414	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Drenaje de absceso perianal/ inserción de sedal	Adalimumab 4 semanas		9,4 x 10 ⁶ /kg
2	55	M	Colitis	524	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 4 semanas	Azatioprina Prednisolona 10 mg	8,2 x 10 ⁶ /kg
3	31	F	Colitis	269	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Colectomía subtotal	Adalimumab 8 semanas	Prednisolona 12,5-15 mg# Enema de prednisolona	9,8 x 10 ⁶ /kg
4	32	F	Colitis	319	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 4 semanas*	Azatioprina	9,8 x 10 ⁶ /kg
5	23	F	Colitis	325	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 4 semanas	Prednisolona 20 mg	7,1 x 10 ⁶ /kg
6	39	F	Colitis	603	Infliximab 6 MP	Drenaje de absceso perianal/ inserción de sedal	Adalimumab 6 meses	Micofenolato Mofetilo Ciprofloxacina	8,0 x 10 ⁶ /kg
7	21	M	Colitis	366	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 4 semanas*	6 MP Prednisolona 25-15 mg#	8,6 x 10 ⁶ /kg
8	27	F	Colitis	344	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Drenaje de absceso perianal/ inserción de sedal	Adalimumab 3 meses	Azatioprina Prednisolona 15 mg	8,3 x 10 ⁶ /kg
9	52	M	Colitis	256	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Drenaje de absceso perianal	Adalimumab 4 semanas	6 MP	8,0 x 10 ⁶ /kg
10	39	F	Colitis + Perianal	498	Infliximab Adalimumab Azatioprina Metotrexato	Nula	Infliximab 12 meses	Azatioprina Prednisolona 35 mg	9,3 x 10 ⁶ /kg

11	31	M	Colitis + Perianal	295	Infliximab Adalimumab 6 MP	Nula	Infliximab 4 meses	6 MP Prednisona 35 mg	$10,1 \times 10^5$ /kg
12	41	M	Ileocolitis	285	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Ileocolónico resección	Adalimumab 4 semanas	Azatioprina	$8,6 \times 10^5$ /kg
13	46	F	Ileocolitis	327	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 10 semanas	Prednisona 20- 15 mg#	$9,0 \times 10^5$ /kg
14	35	M	Colitis + Perianal	397	Infliximab Adalimumab Azatioprina Metotrexato	Drenaje de absceso perianal/inserción de sedal e ileostomía temporal	Adalimumab 6 semanas	Metotrexato Prednisona 10 mg	$9,4 \times 10^5$ /kg
15	23	M	Colitis	259	Infliximab Adalimumab Azatioprina	Nula	Adalimumab 4 semanas	Prednisona 10 mg	$9,7 \times 10^5$ /kg
16	52	F	Ileal	460	Adalimumab Azatioprina 6 MP	Resecciones ileocolónicas/ ileales x 3	Adalimumab 4 semanas*	Loperamida	$8,8 \times 10^5$ /kg

*fracaso primario de un único producto biológico; todos los demás pacientes fracasaron con ambos productos biológicos

#donde se proporciona una variación de la dosis de prednisona, la cifra de la dosis inicial representa la dosis de ingreso al estudio y la última cifra la dosis final del estudio

Tabla 4: CDAI y datos de resultados endoscópicos

Número de paciente	CDAI ingreso	CDAI d 7	CDAI d 14	CDAI d 21	CDAI d 28	CDAI d 42	Respuesta clínica	Remisión clínica	CDEIS ingreso	CDEIS d 42	Mejora endoscópica
1	414	315	330	329	324	466	N	N	9,75	17,5	N
2	524	504	392	320	338	422	S	N	19	18,5	N
3	269	160	143	-	147	122	S	S	19,5	19,5	N
4	319	149	186	201	193	130	S	S	23	18,5	S
5	325	76	180	108	88	44	S	S	17	9,5	S
6	603	362	437	169	160	236	S	N	26	25,3	N
7	366	189	113	68	107	114	S	S	27,5	17,5	S
8	344	382	223	256	177	85	S	S	3,3	0,3	S
9	256	182	159	80	46	81	S	S	19	9,75	S
10	498	338	256	281	135	275	S	N	32,5	31	N
11	295	245	234	222	175	180	S	N	28	8,6	S
12	285	210	227	169	169	128	S	S	33	13	S
13	327	97	8	20	0	50	S	S	6,1	10,2	N
14	397	389	291	202	-	-	-	-	18	-	-
15	259	277	276	244	236	282	N	N	31,5	32	N
16	460	454	390	472	436	436	N	N	9,1	6,25	N

Tabla 5: Datos de resultados de calidad de vida y proteína C reactiva

Número de paciente	IBDQ ingreso	IBDQ d 42	AQoL ingreso	AQoL d 42	CRP ingreso	CRP d 42
1	136	115	87	95	23	45
2	111	148	73	67	4,1	3,1
3	151	138	73	67	48	no medido
4	104	160	85	64	9,5	5,5
5	107	184	98	58	6,6	4,4
6	85	143	79	79	21	16
7	136	207	67	41	13	2,9
8	99	161	90	72	2,9	5
9	150	115	58	43	20	1,9
10	103	148	73	61	36,9	36
11	129	162	85	67	3,1	1,4
12	125	176	100	77	13	18
13	91	no disponible	80	no disponible	6	no disponible
14	88	no medido	117	no medido	38	no medido
15	142	152	76	81	30	13
16	93	94	96	104	2,3	6,1

Nuestros datos sugieren la eficacia de las MSC alogénicas por vía intravenosa en la CD luminal. En 15 pacientes con enfermedad activa de moderada a grave, refractaria a la terapia anti-TNF, cuatro infusiones de 2×10^6 células/kg a intervalos semanales indujeron una respuesta clínica en 12 (80 %), remisión clínica en ocho (53 %) y mejora endoscópica en siete (47 %). La calidad de vida mejoró, en paralelo con la mejora en el CDAI (Irvine y otros, (1994), Gastroenterol; 106: 287-296.). Nuestros datos son los primeros en demostrar efectividad para la enfermedad luminal de forma convincente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cultivar células estromales mesenquimales para la terapia, que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar una muestra de células estromales mesenquimales aisladas de un humano, un camélido, un equino, un canino o un felino en un primer medio de cultivo celular que comprende un primer suero, un primer sustituto de suero y/o una primera fracción de suero seleccionados del grupo que consiste en suero fetal de ternera (FCS) y suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS) durante entre 18 h y 72 h, antes de cambiar el medio con un primer medio de cultivo celular fresco para continuar el cultivo hasta que las células hayan alcanzado una confluencia del 70 al 90 %; y
 - (ii) antes de cosechar las células para la terapia, dicho primer medio de cultivo celular se reemplaza con un segundo medio de cultivo celular que comprende un segundo suero, un segundo sustituto de suero y/o una segunda fracción de suero, cuyo suero o fracción de suero o sustituto de suero tiene la misma especie de origen que las células en cultivo y las células se cultivan durante 20 horas, o durante 21 horas, o durante 22 horas, o durante 23 horas, o durante entre 24 horas a 36 horas.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células en la etapa (ii) se cultivan durante entre 24 horas a 36 horas, preferentemente, durante 24 horas.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una etapa de cosechar las células cultivadas en la etapa (ii).
4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el primer medio y/o el segundo medio comprende un medio base seleccionado del grupo que consiste en DMEM (alto o bajo contenido de glucosa), medio basal de Eagle (MEM), medio F10 de Ham (F10), medio F-12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado de Iscove, M-199, medio de crecimiento de células madre mesenquimales (MSCGM), medio L-15 de Liebovitz, MCDB, DMEM/F12, RPMI 1640, DMEM avanzado (Gibco), DMEM/MCDB201 (Sigma) y CELL-GRO FREE o una de sus combinaciones, preferentemente, el medio en la etapa (i) es DMEM y el medio en la etapa (ii) es DMEM sin rojo de fenol.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el primer suero, el primer sustituto de suero y/o la primera fracción de suero en la etapa (i) es suero fetal de ternera inactivado por calor (HIFCS).
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra de células comprende células estromales mesenquimales humanas.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo suero, el segundo sustituto de suero y/o la segunda fracción de suero en la etapa (ii) es suero humano o albúmina sérica humana, preferentemente, aproximadamente al 2 % v/v.
8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra de células estromales mesenquimales en la etapa (i) se cultiva hasta que las células hayan alcanzado una confluencia entre 70 a 85 %, preferentemente, hasta que las células hayan alcanzado una confluencia del 85 %.
9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde después de la etapa (ii) dichas células cultivadas expresan uno o más marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consiste en CD54, CD61, CD140A y CD201.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde después de la etapa (ii) las células se suspenden en un medio adecuado para la administración terapéutica a un paciente, preferentemente, en donde dichas células se suspenden dentro de una jeringa o un contenedor plegable.
11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa (i) comprende cultivar la muestra de células en el primer medio de cultivo celular durante entre 18 h y 72 h, antes de que las células adherentes se laven con PBS y se reemplacen los medios con un primer medio de cultivo celular fresco para continuar el cultivo hasta que las células hayan alcanzado una confluencia del 70 al 90 %.
12. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la etapa (i) comprende cambios de medio cada 3-4 días hasta que las células hayan alcanzado dicha confluencia del 70 al 90 %.
13. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra de células en la etapa (i) comprende entre $1,0 \times 10^3$ células por cm^2 del frasco de cultivo y $1,0 \times 10^{10}$ células por cm^2 del frasco de cultivo, preferentemente, entre $1,0 \times 10^3$ células por cm^2 del frasco de cultivo y $1,0 \times 10^7$ células por cm^2 del frasco de cultivo.
14. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde en la etapa (ii), cuando se cultivan

- 5 células humanas, entonces el segundo medio de cultivo comprende un sustituto de suero humano, o cuando se cultivan células de camélido, entonces el segundo medio de cultivo comprende un sustituto de suero de camélido, o cuando se cultivan células equinas, entonces el segundo medio de cultivo comprende un sustituto de suero equino, o cuando se cultivan células caninas, entonces el segundo medio de cultivo comprende un sustituto de suero canino, o cuando se cultivan células felinas, entonces el segundo medio de cultivo comprende un sustituto de suero felino.
- 10 15. El método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde las células se cultivan en la etapa (ii) durante 20 horas, o durante 21 horas, o durante 22 horas, o durante 23 horas, o durante entre 24 horas y 36 horas para que las células no comiencen a volverse senescentes.

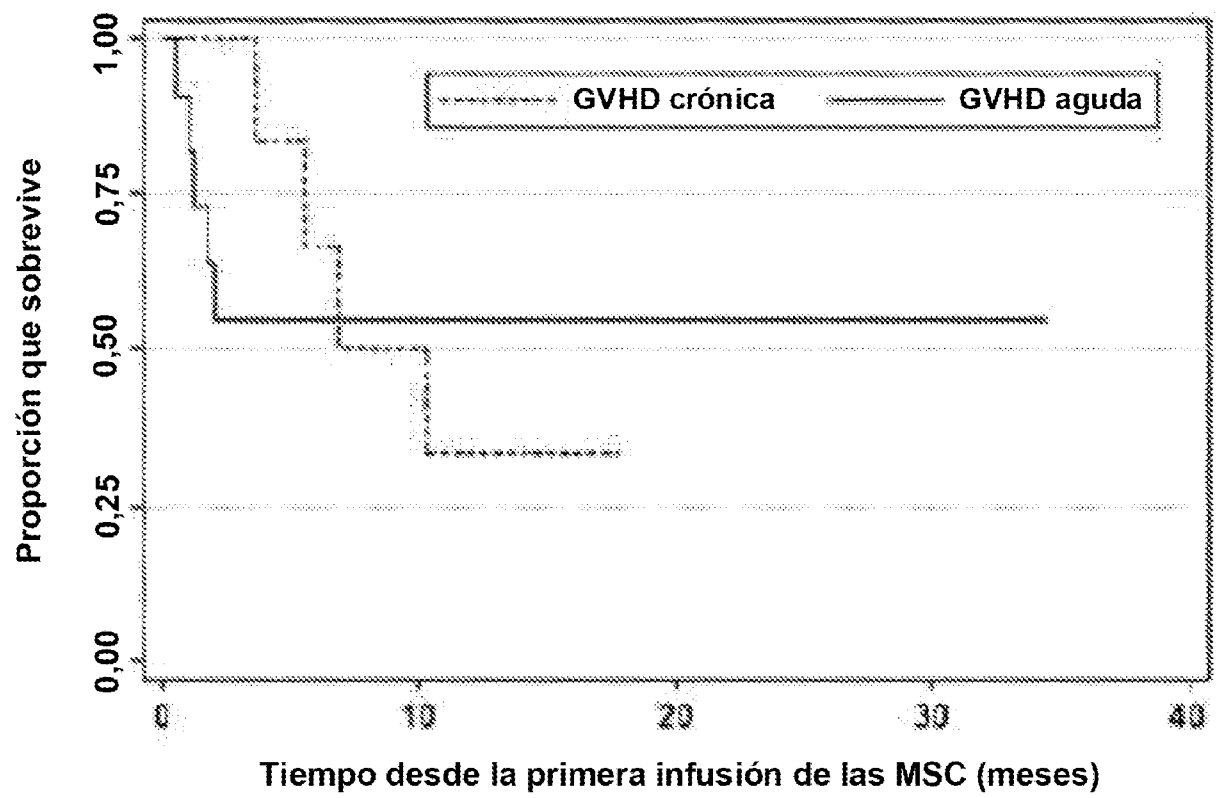


FIGURA 1

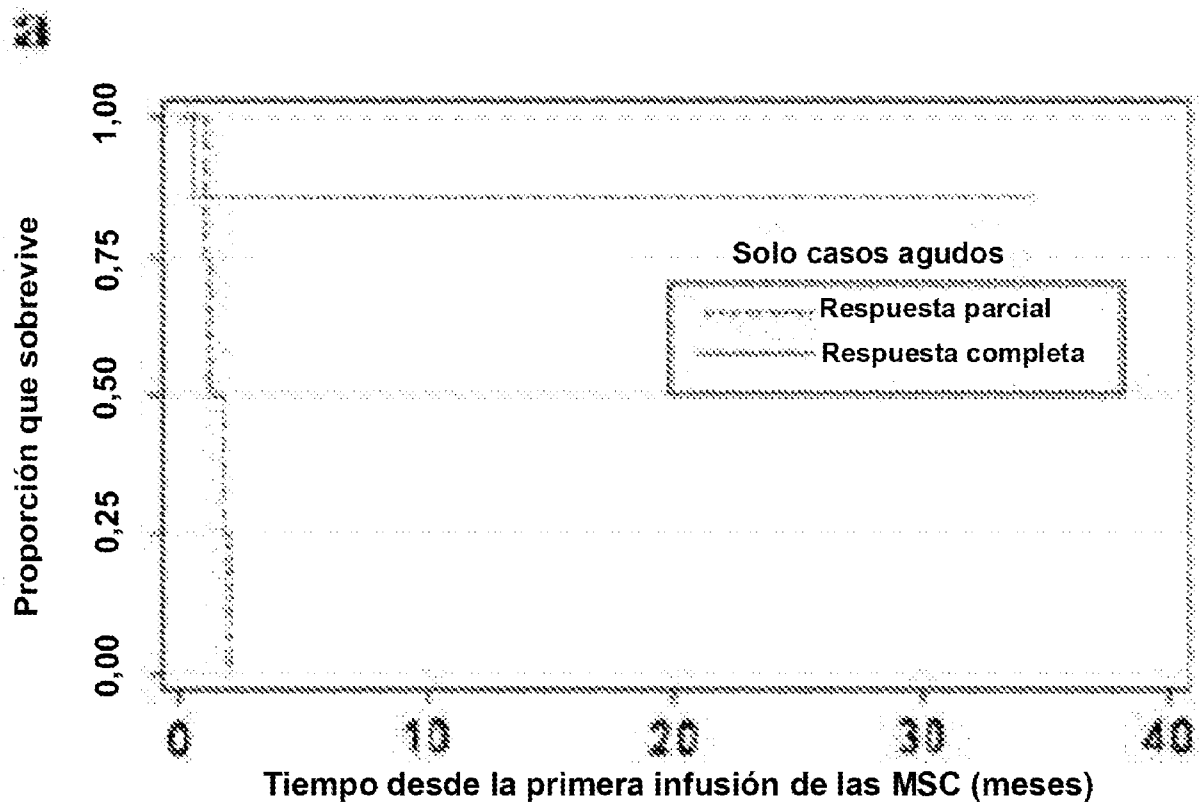


FIGURA 2A

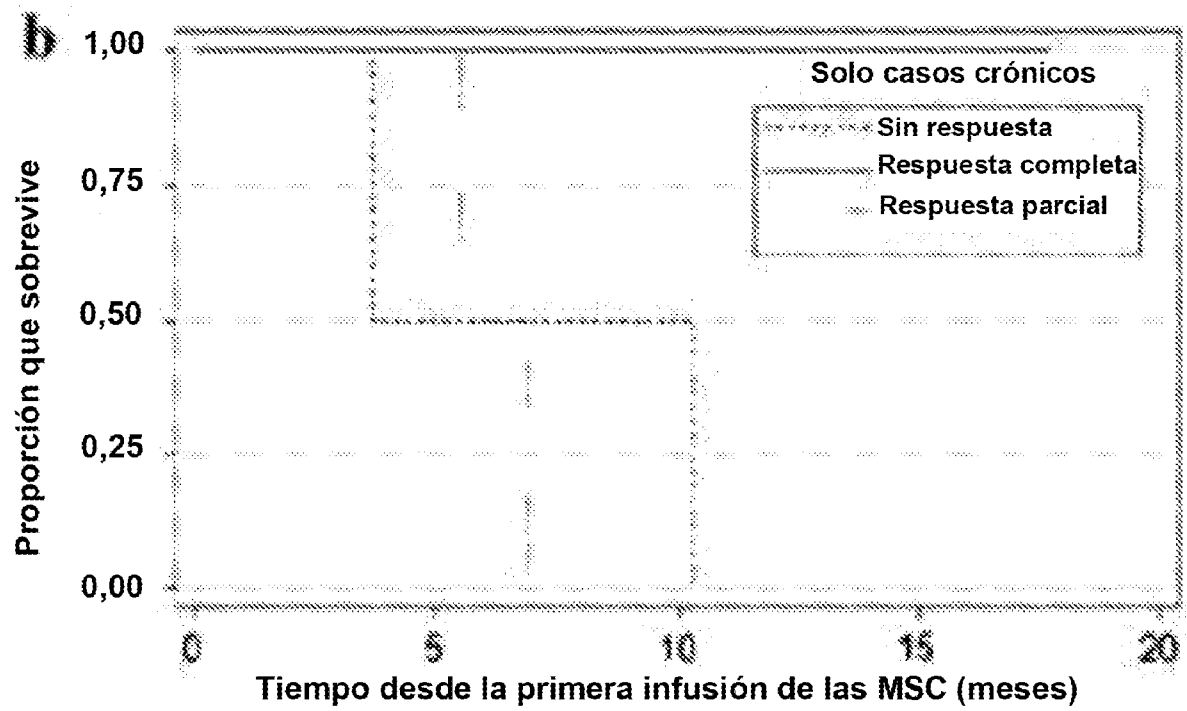


FIGURA 2B

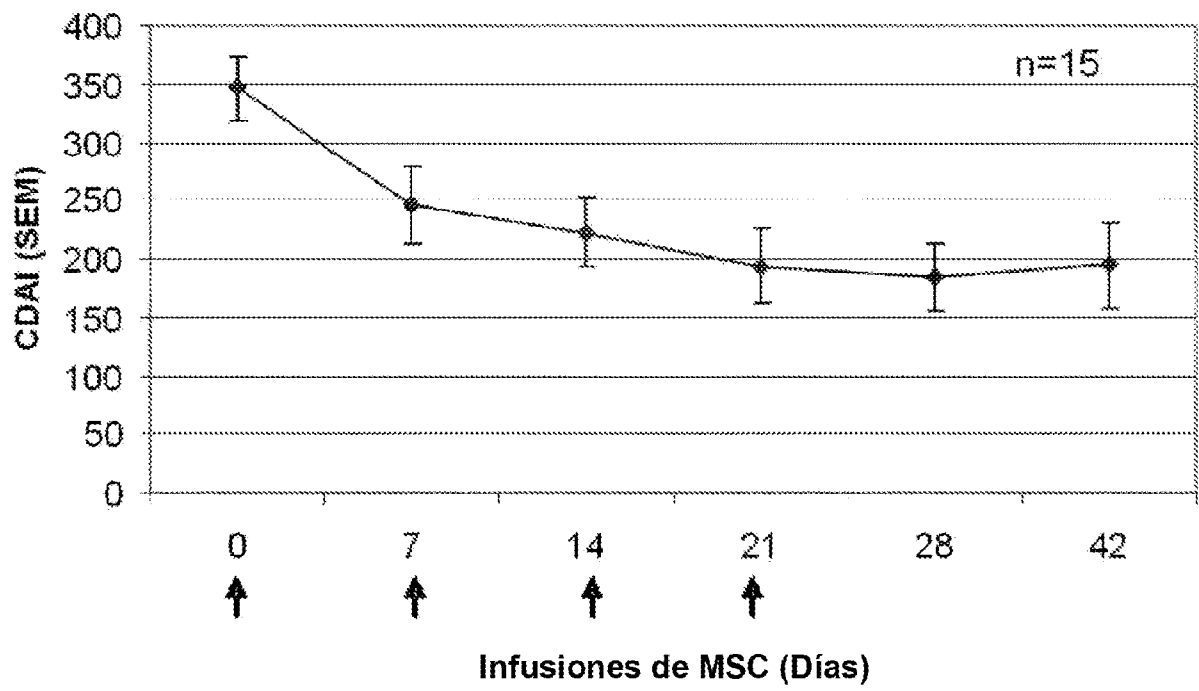


FIGURA 3

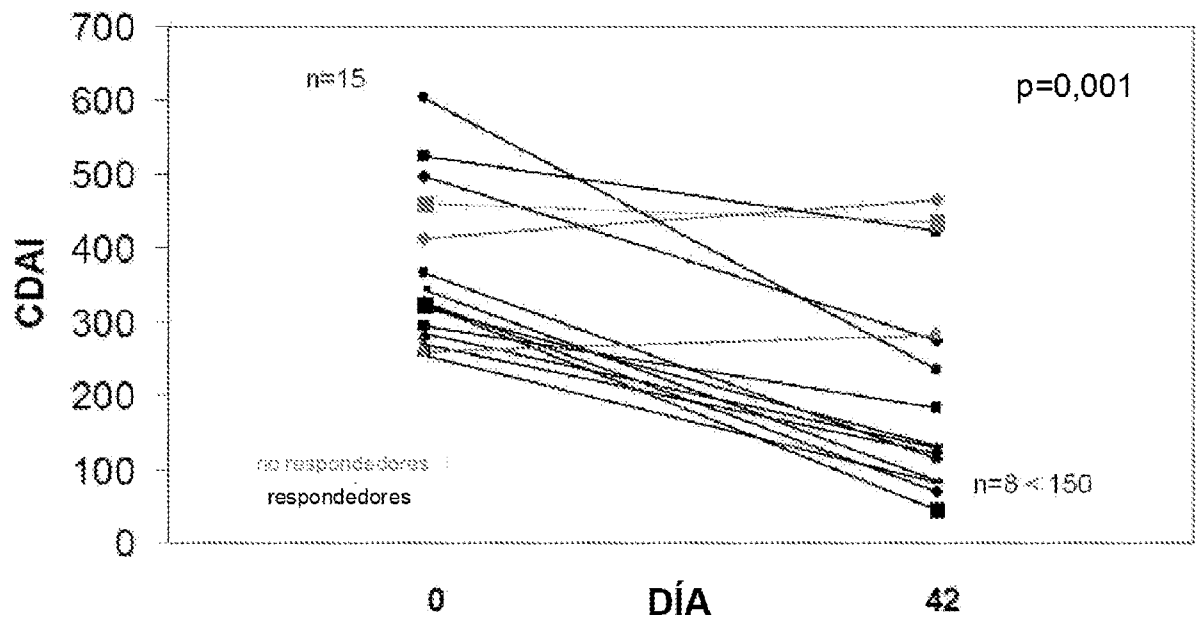


FIGURA 4