

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 923 925**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01)
A61K 35/19 (2015.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2017 E 17211074 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022 EP 3342856**

(54) Título: **Formulaciones de células mononucleares de sangre periférica sometidas a hipoxia**

(30) Prioridad:

29.12.2016 IT 201600132406

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

03.10.2022

(73) Titular/es:

**QUANTIX SWISS SA (100.0%)
Via Olimpia 128
7742 Poschiavo, CH**

(72) Inventor/es:

**COSTA, MASSIMO;
REHAK, LAURA OLGA ELENA y
PANFILI, GRAZIANO**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 923 925 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

Formulaciones de células mononucleares de sangre periférica sometidas a hipoxia

Campo de la invención

5 La presente invención describe una preparación autóloga que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), el concentrado autólogo del que se obtiene y su método de producción.

Descripción

Antecedentes de la técnica

10 La enfermedad aterosclerótica de las arterias de las extremidades inferiores (EAP: Enfermedad Arterial Periférica) es causada por procesos arterioscleróticos existentes en la aorta abdominal inferior, en las arterias ilíaca, femoral, poplítea que reducen el flujo sanguíneo en los vasos de las piernas (Dormandy JA, Ray S. The natural history of peripheral arterial disease. En: Tooke JE, Lowe GDO (Eds). Textbook of vascular medicine. Londres: Arnold, 1996: 162-75).

La formación de placa arterioesclerótica reduce (estenosis) la luz arterial de los vasos perfundidos, hasta llegar en algunos casos a la oclusión completa de los mismos, con la consiguiente reducción o detención del flujo sanguíneo en el distrito afectado.

15 Los síntomas resultantes de la estenosis u oclusión de la luz arterial son extremadamente variables, dependiendo del grado de obstrucción arterial y del desarrollo de la circulación arterial colateral en las extremidades inferiores.

En relación con la gravedad de la misma, la EAP puede presentar, por tanto, distintos perfiles clínicos, variando desde la forma asintomática, hasta el cuadro sintomático (debilidad muscular, *claudicatio intermittens*) hasta la isquemia crítica de las extremidades (ICE), en las que parte o la totalidad de su funcionalidad se ve comprometida por el proceso patológico en curso.

20 La isquemia crítica de las extremidades representa un síndrome que se asocia a una historia natural desfavorable con un resultado caracterizado por una alta tasa de mortalidad y morbilidad (Golomb BA. Peripheral arterial disease: Implications of Morbidity and Mortality. Circulation. 2006; 114:688-699; Diehm C, Allenberg JR, Pittrow D, Mahn M, Tepohl G, Haberl RL, Darius H, Burghaus I, Trampisch HJ, para el Ensayo Epidemiológico Alemán sobre el Grupo de Estudio del Índice del Tobillo-Brazo. Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral arterial disease. Circulation. 2009; 120:2053-2061).

25 Los pacientes más afectados por esta enfermedad son los diabéticos, fumadores, hipercolesterolemicos, sujetos en los que por diferentes motivos etiológicos ya se encuentran en curso procesos arteriopáticos. El 25% de los pacientes sufre amputación del miembro afectado y el 25% fallece en el plazo de un año desde el inicio de la enfermedad.

30 La incidencia en Italia es de unos 15.000 pacientes, para el 30% de los cuales no hay alternativas terapéuticas y está indicada la amputación.

De 2001 a 2010 hubo 11.639 pacientes que fueron sometidos a amputación, de los cuales el 58,6% eran diabéticos (Datos oficiales Ministerio de Salud <http://www.archeo.salute.gov.it/ricoveriOspedalieri/ricoveriOspedalieri.jsp>).

35 La incidencia de diabetes y de enfermedad arterial periférica (EAP) está aumentando debido al envejecimiento de la población (Savji N, Rockman CB, Skolnick AH, Guo Y, Adelman MA, Riles T, Berger JS. Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects. Journal of the American College of Cardiology. 2013; 61:1736-1743; Giorda CB, Avogaro A, Maggini M, Lombardo F, Mannucci E, Turco S, Alegiani SS, Raschetti R, Velussi M, Ferrannini E. Recurrence of cardiovascular Events in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2008; 31:2154-2159), con la mayoría de pacientes sintomáticos mayores de 60 años: 40 alrededor del 0,6% en sujetos de edades comprendidas entre 45-54 años, 2,5% entre 55-64 años, 8,8% entre 65-74 años (Dormandy JA, Ray S. The natural history of peripheral arterial disease. En: Tooke JE, Lowe GDO (Eds). Textbook of vascular medicine. Londres: Arnold, 1996: 162-75; Stoffers HE et al. Prevalence in general practice. En: Fowkes FGR. Epidemiology of peripheral vascular disease. Londres: Springer, 1991: 109-15).

45 Si bien la terapia quirúrgica y/o intravascular ha reducido la incidencia de amputaciones, el porcentaje de cortes en la isquemia crítica del miembro sigue siendo elevado (25%), aumentando ante el envejecimiento de la población y el incremento incidente de diabetes (Giorda CB, Avogaro A, Maggini M, Lombardo F, Mannucci E, Turco S, Alegiani SS, Raschetti R, Velussi M, Ferrannini E. Recurrence of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2008; 31:2154-2159.)

50 Desde hace mucho tiempo se sabe que los pacientes afectados por enfermedades vasculares isquémicas tienden a desarrollar espontáneamente vasos colaterales que evitan la oclusión, garantizando así la perfusión de la extremidad.

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de enfoques terapéuticos innovadores para estimular los mecanismos de "autocuración" del organismo, concentrándose en las estrategias para activar el

crecimiento de vasos sanguíneos compensatorios que pueden ayudar a estabilizar el déficit de flujo, preservando así la supervivencia del tejido y la función del órgano.

El sistema de células autólogas de alta capacidad angiogénica y vasculogénica, se enmarca en este escenario como un nuevo abordaje terapéutico en el tratamiento de la EAP y en particular en los casos de ICE.

5 Las células mononucleares de sangre periférica, indicadas en la bibliografía científica como PBMNCs, están representadas por las clases de monocitos/macrófagos y linfocitos y constituyen el sustrato celular autólogo de excelencia para el tratamiento de pacientes con isquemia crítica de las extremidades no revascularizable.

Las metodologías en uso hasta la fecha para producir concentraciones que contienen PBMNCs proporcionan que el tratamiento del material biológico se produzca en el quirófano, en el que se extrae la sangre autóloga.

10 Opcionalmente congelada como tal para ser almacenada en el tiempo, la sangre del paciente es luego concentrada *in situ* (hospital), donde se realiza la filtración selectiva del material celular mediante el uso de sistemas de aféresis y/o mediante el uso de ayuda médica-quirúrgica, es decir, filtros, sistemas de centrifugación.

15 Sin embargo, dichos sistemas de filtración selectiva tienen límites insuperables que afectan a la composición cualitativa/cuantitativa de la preparación final, al tratamiento de la misma y consecuentemente al almacenamiento de la misma a lo largo del tiempo.

En particular, las preparaciones obtenidas por los sistemas de filtración mencionados anteriormente están sujetas a:

- Alta contaminación de neutrófilos, componentes celulares que inhiben significativamente la angiogénesis de las PBMNCs;
- Contaminación de glóbulos rojos, cuyo efecto inflamatorio local hace que la administración intramuscular sea menos apreciada por el paciente y puede retrasar parcialmente el efecto antiinflamatorio de la concentración celular;
- Poca cantidad de plaquetas, subgrupo celular que puede, por otro lado, aumentar la capacidad angiogénica de las células mononucleares periféricas, trabajando así en sinergia con las PBMNCs.
- Resuspensión de la concentración en solución salina donde, en cambio, una resuspensión en plasma autólogo podría amplificar las señales angiogénicas liberadas.

25 Las variaciones de contenido antes mencionadas, además de hacer difícil estandarizar la composición cualitativa/cuantitativa de la concentración final, alteran la eficacia de la misma, cuya actividad biológica en el lugar de la inyección depende de la concentración absoluta y relativa de cada subgrupo celular presente.

La concentración así obtenida, debe ser administrada al paciente en las 6-8 horas siguientes al tratamiento y no puede almacenarse más, sin que se produzca alteración en su contenido y eficacia.

30 Además, la resuspensión después de la administración se realiza normalmente en solución salina en lugar de plasma, elección que reduce potencialmente el efecto biológico local provocado por la preparación celular.

Por ejemplo, Valeri y colegas (C.R. Valeri et al., Effects of temperatures, the duration of frozen storage, and the freezing container on the *in vitro* measurements in human peripheral blood mononuclear cells, TRANSFUSION, vol. 36, No. 4, 1996, páginas 303-308) describe un estudio que tiene como objetivo evaluar la influencia de la temperatura, la duración del almacenamiento en estado congelado y el tipo de contenedor crioprotector en la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs). Según el estudio, las PBMNCs se aíslan con el procedimiento de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-hypaque, a partir de la capa leucocitaria obtenida durante la plaquetaféresis de muestras de sangre; las PBMNCs se tratan con DMSO para obtener una concentración final de DMSO del 10%; cada unidad se divide en 6 porciones y se recoge en recipientes de diferente tipo; cada porción se congela a -80 °C (2-4 °C/min) y se conserva a -80 °C, -135 °C o -150 °C según el tipo de envase utilizado. Una vez congeladas, las muestras se lavan con soluciones salinas y se centrifugan; se descarta el sobrenadante y luego se suspenden las PBMNCs en el plasma autólogo obtenido de los pacientes. El autor cree realmente que el lavado posterior a la descongelación reduce el riesgo de efectos tóxicos y parece mejorar la supervivencia *in vivo* (C. Robert Valeri Cryopreservation of human platelets and bone marrow and peripheral blood totipotential mononuclear stem cells, ANNALS OF NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, Vol 459, no.1 Hematopoietic, 1 de diciembre de 1985, páginas 353-366).

50 Recientes estudios *in vitro* han puesto de manifiesto cómo los tratamientos hipódicos pueden inducir a las células a expresar su capacidad angiogénica, lo que representa una posibilidad de mejora en la eficacia del tratamiento de los productos de terapia de tejidos isquémicos celulares (Hypoxia-based strategies for angiogenic induction - The dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration - Organogenesis 9:4, 261-272, octubre/noviembre/diciembre de 2013; © 2013 Landes Bioscience).

Sumario de la invención

El solicitante ha encontrado que es posible superar los inconvenientes mencionados anteriormente a través de la preparación autóloga (A) de la presente invención, sustancialmente libre de glóbulos rojos y empobrecida en neutrófilos, que comprende células mononucleares suspendidas en plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) u opcionalmente en concentrado de plaquetas (B').

Un objeto de la presente invención es una preparación autóloga (A), obtenida en el momento de su uso para dilución adecuada de un concentrado (C), en plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o en concentrado de plaquetas (B').

El concentrado (C) se prepara bajo campana de flujo laminar A en un ambiente estéril B dentro de una fábrica de células autorizada para la producción de productos de terapia avanzada para experimentos farmacéuticos, con un método de separación controlado y estandarizado, que responde a los requisitos de calidad definidos por los reglamentos GMP vigentes en el campo de los Medicamentos de Terapias Avanzadas (ATMP).

Descripción de las figuras

Figura 1: Medición de la viabilidad celular del concentrado autólogo descongelado, preparado con DMSO al 3% y al 10%. Las mediciones se han realizado en el momento de la descongelación ($t = 0$), y después de 1, 7, 30 y 45 días desde la descongelación ($t = 1$, $t = 7$, $t = 30$, $t = 45$).

Figura 2: Medición del rendimiento celular del concentrado autólogo descongelado, preparado con DMSO al 3% y al 10%. Las mediciones se han realizado en el momento de la descongelación ($t = 0$), y después de 1, 7, 30 y 45 días desde la descongelación ($t = 1$, $t = 7$, $t = 30$, $t = 45$).

Figura 3: Medida de la viabilidad celular del concentrado autólogo descongelado, preparado con DMSO al 10 y al 5% y albúmina humana en concentraciones iguales a 200 g/L.

Figura 4: Medida de la viabilidad celular del concentrado autólogo descongelado, preparado con DMSO al 5% y albúmina humana al 5%. Las medidas se han realizado en el momento de la descongelación ($t = 0$), y después de 7 días desde la descongelación, sobre las siguientes muestras:

- DMSO plasma 10% albúmina 5%
- DMSO plasma 5 % albúmina 5 %
- Solución salina/plasma 50% DMSO 10%
- Solución salina/ plasma 50% DMSO 5%

Figura 5: Caracterización por citometría de flujo de las subpoblaciones celulares. linfocitos T (linfo T); linfocitos B (linfo B); Monocitos (Mono); Neutrófilos (Neutro/Granulo); Linfocitos Asesinos Naturales (NK).

Figura 6: Hipoxia de ARNm de VEGF a 1 h en cultivo fresco (ctl fresco), después de hipoxia en cultivo fresco (ipox fresco), control congelado (ctl cong) y congelado tras hipoxia (ipox cong)

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es una preparación autóloga (A) sustancialmente exenta de glóbulos rojos y empobrecida en neutrófilos, que comprende:

a) Células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs),
b) Dimetilsulfóxido (DMSO) en concentraciones comprendidas entre 0,3% y 1,3% (v/v),
c) Plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B), que tiene una concentración de plaquetas comprendida entre 700.000 plaquetas/ μ L y 1.200.000 plaquetas/ μ L; o concentrado de plaquetas (B'), que tiene una concentración de plaquetas comprendida entre 7.000.000 plaquetas/ μ L y 12.000.000 plaquetas/ μ L,

obteniéndose dicha preparación autóloga (A) con un proceso que comprende las siguientes etapas:

- i) Obtención, mediante el tratamiento de una muestra de sangre extraída del paciente, de PBMNCs autólogas y plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B'), respectivamente;
- ii) Adición de DMSO a las PBMNCs obtenidas en la etapa (i), en una concentración comprendida entre el 3% y el 5% (v/v) disuelto en una porción de plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') preparados en etapa i) y obtención de un concentrado autólogo (C);
- iii) Congelación del concentrado autólogo (C) del punto ii) y el plasma autólogo 20 enriquecido en plaquetas

(B) o concentrado de plaquetas (B') tal como se obtuvo en la etapa i);

iv) Envío del concentrado autólogo (C) y del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') de la etapa iii) al centro de salud deseado; 25

5 v) Descongelación, en el momento de su uso, del concentrado autólogo (C) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') del punto iv),

vi) Dilución, de 7 a 10 veces, del volumen de concentrado autólogo descongelado (C) con plasma autólogo descongelado (B) o concentrado de plaquetas descongelado (B') y obtención la preparación autóloga (A),

10 en donde dicho concentrado autólogo (C) comprende células mononucleares (PBMNCs), no contiene glóbulos rojos, está empobrecido en neutrófilos y comprende dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración comprendida entre el 3 % en volumen y el 5 % en volumen en función del volumen del concentrado autólogo (C).

Para los objetos de la presente invención, preparación autóloga (A) significa un producto celular, de uso terapéutico, en el que las células destinadas a provocar el efecto biológico se extraen de la sangre del paciente, se procesan fuera del organismo y finalmente se reintroducen en el paciente original para el tratamiento de una enfermedad.

15 En los objetos de la presente invención, se entiende por células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) todas las células sanguíneas circulantes, caracterizadas histológicamente por un núcleo redondo y que comprenden monocitos, linfocitos, células mononucleares (MNC) y el total de células nucleadas.

La preparación autóloga (A) de la presente invención está sustancialmente libre de glóbulos rojos, donde sustancialmente libre de glóbulos rojos significa una preparación en la que el contenido de glóbulos rojos está por debajo del límite detectable.

20 Preferiblemente, la preparación autóloga (A) está libre de glóbulos rojos, donde libre significa que la concentración de glóbulos rojos es inferior al 0,01%.

Para los objetos de la presente invención, preparación autóloga empobrecida en neutrófilos (A) significa una preparación autóloga en la que el número de neutrófilos es inferior a $0,030 \times 10^8$.

25 Incluso más preferiblemente, la preparación autóloga (A) contiene un contenido de neutrófilos comprendido entre $0,015 \times 10^8$ y $0,029 \times 10^8$ (75 y 145 células/ μL).

Para los objetos de la presente invención, el término plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) significa la fracción líquida de la sangre, libre de fracción corpuscular que comprende las PBMNCs y libre de glóbulos rojos, mediante un proceso de tratamiento de una muestra de sangre total.

30 Cabe señalar que el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) se obtiene mediante el tratamiento de una muestra de sangre total extraída del paciente, procesada fuera del organismo y finalmente reintroducida en el paciente original para el tratamiento de una enfermedad.

En otras palabras, dicha preparación autóloga (A) y dicho concentrado autólogo enriquecido en plaquetas (B) se obtienen de un mismo paciente.

35 Para los objetos de la presente invención, se entiende por concentrado de plaquetas (B') la fase líquida más pesada procedente de la centrifugación del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B).

Cabe señalar que el concentrado de plaquetas (B') también es autólogo, según las definiciones dadas anteriormente, ya que se obtiene por centrifugación del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B).

40 Según una realización de la invención, la preparación autóloga (A) contiene el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B), donde la concentración de plaquetas en dicho plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) está comprendida entre 700.000 plaquetas/ μL y 1.200.000 plaquetas/ μL .

Alternativamente, la preparación autóloga (A) contiene el concentrado de plaquetas (B'), donde la concentración de plaquetas en dicho concentrado de plaquetas (B') está comprendida entre 7.000.000 plaquetas/ μL y 12.000.000 plaquetas/ μL .

45 El plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o el concentrado de plaquetas (B') ya contienen factores de crecimiento implicados en los procesos de regeneración tisular y en los procesos angiogénicos, entre los que destacan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- α y TGF- β .

El sistema de preparación autóloga de la presente invención, en virtud de la alta concentración de plaquetas, aumenta la expresión de VEGF, producido fisiológicamente por las células musculares lisas y por las endoteliales, configurando un sistema de señalización paracrino, en el que las células musculares lisas productoras de VEGF, y las células

endoteliales, situadas cerca de las primeras y éstas también productoras de VEGF, son diana del factor de crecimiento endotelial vascular.

5 Los principales efectos del VEGF consisten en la inducción de la proliferación y migración de células endoteliales, en el aumento de la permeabilidad capilar, en la inducción de la liberación de nitróxido y en la inducción de la expresión de enzimas tales como las serina proteasas y las colagenasas intersticiales que tienen un papel importante en la mediación de los fenómenos de remodelación intersticial que siempre acompañan a los procesos de neoformación vascular.

El efecto biológico del FGF-2 comprende una intensa actividad mitógena frente a las células endoteliales y las células musculares vasculares lisas.

Según una realización preferida, la preparación autóloga (A) contiene albúmina.

10 Dicha albúmina es preferiblemente albúmina de suero humano.

En la preparación autóloga (A) de la presente invención, las células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) comprenden preferentemente:

- Células nucleadas totales (TNCs) comprendidas entre $1,26 \times 10^8$ ($6,3 \times 10^3$ células/ μL) y $1,89 \times 10^8$ ($9,45 \times 10^3$ células/ μL),

15 – Linfocitos comprendidos entre $0,97 \times 10^8$ ($4,85 \times 10^3$ células/ μL) y $1,45 \times 10^8$ ($7,25 \times 10^3$ células/ μL),

- Monocitos comprendidos entre $0,28 \times 10^8$ ($1,4 \times 10^3$ células/ μL) y $0,42 \times 10^8$ ($2,1 \times 10^3$ células/ μL),

- Células mononucleares (MNC) comprendidas entre $1,25 \times 10^8$ ($6,25 \times 10^3$ células/ μL) y $1,87 \times 10^8$ ($9,35 \times 10^3$ células/ μL).

20 El conjunto de células mononucleares de sangre periférica presentes en la preparación autóloga de la presente invención, en combinación con el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B), o el concentrado de plaquetas (B') participan en la amplificación del efecto paracrino local, y exhiben un efecto sinérgico tanto en la actividad angiogénica como antiinflamatoria.

25 Estudios científicos recientes (Tateno K et al., Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization circulation, Research Volume 98 (9): 1194-1202 12 de mayo de 200) parecen sugerir que el mensajero más implicado en la estimulación paracrina de las células mononucleares de sangre periférica es la citoquina IL-1 β (interleuquina1 β).

El conjunto de células mononucleares de sangre periférica estimula la regeneración tisular y, mediante el aumento de la expresión de IL-1 β por los miocitos regenerados, promueve la neovascularización por inducción de la expresión de factores angiogénicos, tales como, por ejemplo, MCP-1 (proteína quimioatractante de monocitos -1) y VEGF.

30 Los monocitos y las plaquetas aumentan la liberación de citoquinas y moléculas de adhesión celular (selectina, ICAM-1, VCAM-1), responsables a su vez de la expresión del VEGF y del FGF, así como de otros factores de crecimiento vascular.

35 El uso de plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') como medio de suspensión de las células mononucleares de sangre periférica, no sólo tiene la gran ventaja de reciclar material biológico que de otro modo se perdería, sino que también permite resuspender la fracción mononuclear de la sangre en un componente líquido activo, rico en factores de crecimiento, ausente en las soluciones salinas típicamente utilizadas en el estado de la técnica.

40 El uso de plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') permite por tanto almacenar los sistemas de señalización autocrina en sangre, que se perderían por agotamiento del plasma y de la fracción de plaquetas, responsables además de la amplificación del efecto biológico provocado por la preparación autóloga de la presente invención, junto con la concentración selectiva de componentes sanguíneos.

La preparación autóloga (A) de la presente invención está destinada a ser utilizada como medicamento.

La preparación autóloga (A) de la presente invención está destinada al uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica (EAP), de la isquemia crítica de las extremidades (ICE) y del pie diabético.

45 La preparación autóloga (A) de la presente invención se obtiene por dilución, en plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o en concentrado de plaquetas (B'), de un concentrado autólogo (C) que comprende células mononucleares de sangre periférica (PNMNCs), en donde dicho concentrado autólogo (C) está libre de glóbulos rojos, empobrecido en neutrófilos y comprende dimetilsulfóxido (DMSO) en concentraciones comprendidas entre el 3% y el 5% en volumen sobre el volumen del concentrado autólogo (C).

50 En una realización particularmente preferida, la preparación autóloga (A) se obtiene por dilución de dicho concentrado autólogo (C), que comprende además albúmina.

Aún más preferiblemente, el concentrado autólogo comprende las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC):

- Células nucleadas totales (TNC), comprendidas entre $10,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $13,6 \times 10^3/\mu\text{L}$,
 - Linfocitos, comprendidos entre $5,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $7,0 \times 10^3/\mu\text{L}$,
 - Monocitos, comprendidos entre $1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $2,0 \times 10^3/\mu\text{L}$,
- 5 – Células mononucleares (MNCs), comprendidas entre $6,2 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $9,3 \times 10^3/\mu\text{L}$.

El concentrado autólogo (C) según la presente invención comprende preferiblemente una concentración de neutrófilos que varía de $0,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $0,2 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Como ya se ha explicado, la preparación autóloga (A) objeto de la presente invención se obtiene mediante un proceso que comprende en particular las siguientes etapas:

- 10 i) Obtención, mediante el tratamiento de una muestra de sangre extraída del paciente, de PBMNCs autólogas y plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B'), respectivamente;
- ii) Adición de DMSO a las PBMNCs obtenidas en la etapa (i), en una concentración comprendida entre el 3% y el 5% (v/v) disuelto en una porción de plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') preparados en la etapa i) y obtención del concentrado autólogo (C);
- 15 iii) Congelación del concentrado autólogo (C) del punto ii) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') tal como se obtiene en la etapa i);
- iv) Envío del concentrado autólogo (C) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') de la etapa iii) al sitio hospitalario de uso;
- 20 v) Descongelación en el momento del uso del concentrado autólogo (C) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') del punto iv),
- vi) Dilución de 7 a 10 veces, preferiblemente 8 veces, del volumen del concentrado autólogo descongelado (C), con plasma autólogo (B) o concentrado de plaquetas descongelado (B') y obtención de la preparación autóloga (A).

Cabe señalar que dicha etapa de dilución vi) permite ventajosamente diluir el DMSO y al mismo tiempo obtener las concentraciones efectivas de las células mononucleares de sangre periférica contenidas en la preparación autóloga (A).

- 25 25 La dilución de DMSO permite ventajosamente eliminar la toxicidad in vivo en el momento de la implantación.

Según una realización preferida, la etapa de dilución vi) del concentrado autólogo descongelado (C), con el plasma autólogo (B) o concentrado de plaquetas (B'), es la única etapa de dilución del proceso de preparación de la preparación autóloga (A) para reducir las concentraciones de DMSO en la preparación autóloga (A).

- 30 Preferiblemente, el proceso de preparación de la preparación autóloga (A) objeto de la presente solicitud no comprende ninguna etapa de aclarado para reducir las concentraciones de DMSO en la preparación autóloga (A).

Por lo tanto, la preparación (A) se aplica al paciente que necesita dicho tratamiento.

En una realización preferida, la etapa ii) proporciona la adición adicional de albúmina a las PBMNCs.

- 35 En una realización particularmente preferida, el proceso para la preparación de la preparación autóloga (A), objeto de la presente invención, proporciona que el concentrado autólogo (C) obtenido en el punto ii), sea preferiblemente preacondicionado en hipoxia, a una concentración de O₂, antes de la etapa de congelación del punto iii).

Tal preacondicionamiento hipódico permite aumentar considerablemente la capacidad angiogénica terapéutica de la preparación en los tejidos isquémicos, y en particular la liberación de importantes factores angiogénicos tales como, por ejemplo, el VEGF (Fig. 6).

- 40 Los datos experimentales mostrados en la Fig. 6 muestran cómo el concentrado autólogo fresco (no congelado), preacondicionado con hipoxia (ipox fresco), se caracteriza por una mayor liberación de VEGF (26,73%) con respecto al control (ctl fresco), que consiste en concentrado autólogo fresco sin tratar (1%).

- 45 Aún más interesante, la liberación de factores angiogénicos, inducida por el preacondicionamiento hipódico, se mantiene incluso después de la congelación (Fig. 6): el concentrado autólogo hipódico preacondicionado y congelado (ipox cong) se caracteriza por un aumento de la liberación de factores angiogénicos (34,02%) con respecto al concentrado autólogo fresco preacondicionado hipódico congelado (ipox fresco = 26,73%).

La etapa i) o la preparación de PBMNCs y del plasma autólogo (B) o del concentrado de plaquetas (B') se obtiene

preferentemente mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

I. Dilución volumétrica 1:1 de la sangre extraída del paciente en un tampón biológicamente compatible y en presencia de un anticoagulante.

5 II. Carga, en proporción volumétrica 1:1, dentro de tubos con septum interno, de sangre proveniente de la etapa (I) y una solución de polímero de gradiente de densidad Ficoll;

III. Centrifugación de los tubos de la etapa (II) a 1200 x g durante 10 minutos, a temperatura ambiente y separación del sobrenadante formado por células mononucleares (PBMNCs) del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B).

10 IV. Lavado de las PBMNCs provenientes de la etapa (III) dos veces, con un sistema tampón biológicamente compatible, mediante centrifugación a 300 x g durante 8 minutos.

V. Opcionalmente, concentración del plasma autólogo (B) por centrifugación y separación de la fracción más pesada y obtención el concentrado de plaquetas (B').

En la etapa (ii) se prepara la concentración autóloga (C) diluyendo las PBMNCs procedentes de la etapa (i), con una porción volumétrica específica, preferiblemente comprendida entre 8-12 cm³, más preferiblemente de 10 cm³ de plasma autólogo (B), del apartado III, que comprende del 3% al 5% de DMSO y del 1% al 5% de albúmina.

15 La congelación o etapa (iii) del proceso objeto de la presente invención se realiza preferiblemente a -80°C.

El concentrado autólogo así obtenido, una vez congelado, podrá almacenarse a la misma temperatura durante un período máximo de 2 años.

20 En otra realización, la congelación y el almacenamiento del concentrado se realizan preferiblemente mediante reducción de temperatura controlada en depósitos de vapores de nitrógeno líquido, donde el compuesto alcanza la temperatura de -140 °C en 1 hora. En este caso, el material compuesto puede almacenarse durante un período máximo de 5 años.

A título ilustrativo y no limitativo, se proporciona un ejemplo relativo a la preparación autóloga según la presente invención.

Ejemplo 1

25 En este ejemplo en la siguiente tabla 1, en la columna 4 se reportan los valores absolutos de conteo celular de la preparación autóloga objeto de la presente invención, obtenidos con la concentración autóloga de PBMNCs de la columna 2 de la tabla 1.

Tabla 1. Concentración de PBMNCs después del método Sepmate/Fitcoll	Columna 1 (10 ³ /μl)	Columna 2 (10 ³ /μl)	Columna 3	Columna 4
	Concentración en sangre completa (REFERENCIA)	Concentración de PBMNCs (después de Ficoll)	Factor de concentración	Dosis (alícuota de DMSO al 5% y albúmina al 5%)
TNCs	7,23 ± 0,51	12,045 ± 1,53	1,67	1,58 x 10 ⁸
RBCs	4,12 ± 0,5	0	-	-
Plaquetas*	226,6 ± 56	926,6 ± 67	4,01	152,35 x 10 ⁸
Neutrófilos	5,025 ± 0,88	0,13 ± 0,07	0,33	0,026 x 10 ⁸
Linfocitos	1,42 ± 0,11	6,045 ± 0,88	4,26	1,21 x 10 ⁸
Monocitos	0,40 ± 0,13	1,725 ± 0,70	4,37	0,35 x 10 ⁸
MNCs	1,82	7,77	4,3	1,56 x 10 ⁸

30 El método para producir la preparación autóloga de acuerdo con la presente invención, que comprende las siguientes etapas de:

A partir de una sola muestra de sangre (200 mL), obtener dos alícuotas de concentrado de 2,5 mL cada una (5 mL en total), que comprendan cada PBMNCs en las concentraciones indicadas en la columna 2 de la Tabla 1.

Cada alícuota de 2,5 mL corresponde a una dosis de preparación autóloga a implantar.

Por cada 5 mL de concentrado autólogo de células mononucleares, obtener 20 mL de plasma autólogo enriquecido en plaquetas, a partir de una misma muestra de sangre (200 mL).

El tratamiento descrito anteriormente permite aislar las PBMNCs del plasma autólogo, eliminando el riesgo de contaminación por glóbulos rojos y reduciendo el contenido de neutrófilos.

- 5 Dicho método de aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica da como resultado una alta estandarización del producto, tanto en cuanto a la fracción de células mononucleares de sangre periférica, como en cuanto a la fracción de plasma enriquecido en proteínas.

El concentrado y el plasma así obtenidos se congelan luego como en el punto iv) descrito anteriormente y se almacenan como tales hasta que sea necesario.

- 10 A pesar de las bajas concentraciones de DMSO, generalmente utilizadas en concentraciones de alrededor del 10% en las técnicas de almacenamiento celular, el concentrado autólogo de la presente invención mantiene una alta viabilidad celular a lo largo del tiempo, como lo demuestran los datos experimentales de las Figuras 1, 2 y 3.

Se realizaron dos ensayos con diferentes concentraciones de DMSO, al 3% y al 10% respectivamente, midiendo la viabilidad del concentrado después de la descongelación, y antes de formar la preparación por suspensión.

- 15 La viabilidad se midió al momento de la preparación ($t = 0$) y después de 1, 7, 30 y 45 días desde la preparación ($t = 1$, $t = 7$, $t = 30$, $t = 45$)

Los datos de viabilidad informados en la Figura 1 muestran cómo el DMSO almacena mejor las células a lo largo del tiempo, con un valor de viabilidad particularmente alto (97%) después de 45 días desde la descongelación del concentrado autólogo.

- 20 De manera similar a la medición de la viabilidad, se midió el rendimiento celular del concentrado autólogo descongelado, cuando se preparó con DMSO al 3% y al 10%,

Los datos así obtenidos, presentados en la figura 2, muestran un mejor rendimiento para el concentrado que contiene las mayores concentraciones de DMSO (10%), con un valor porcentual del 93,3% tras 45 días desde la descongelación del sustrato celular.

- 25 El concentrado autólogo preparado con DMSO al 3% guarda un rendimiento óptimo hasta el día de la descongelación (100%), reduciéndose a la mitad solo al séptimo día después de la descongelación, indicando en todo caso un producto de alta calidad, para ser utilizado inmediatamente.

Una mejora adicional de la viabilidad se obtiene congelando en plasma, albúmina al 5% y DMSO al 5% (Fig. 4).

- 30 La descongelación en el momento del uso proporciona que cada alícuota de 2,5 mL de concentrado se diluya en 20 mL de plasma autólogo, según el método de producción de la preparación autóloga descrito anteriormente.

La suspensión del concentrado autólogo en plasma permite diluir el DMSO hasta concentraciones comprendidas entre el 0,3% y el 1,3%, eliminando así el riesgo de toxicidad en el momento de la implantación.

Al mismo tiempo que se diluye el crioconservante, la suspensión en plasma permite obtener las concentraciones celulares adecuadas para la administración y para la exhibición del efecto terapéutico.

- 35 Las ventajas que tiene la preparación autóloga de la presente invención con respecto a las preparaciones autólogas conocidos en el estado de la técnica pueden resumirse así:

- Alta estandarización y reproducibilidad respondiendo a las directrices establecidas por la Agencia Europea de Medicamentos para la producción de especialidades medicinales que se enmarcan en el reglamento de Terapias Avanzadas (ATMPs – Reglamento europeo 1394/2007);

- 40 – Optimización de la muestra de sangre a tratar y obtención de la misma dos alícuotas de concentrado autólogo, así como plasma enriquecido en plaquetas;

- Producto congelable y descongelable, que permite un fácil manejo del material biológico, para ser descongelado y restituido al momento de su uso;

- Fácil almacenamiento en forma congelada, por largos tiempos;

- 45 – Mantenimiento de una buena viabilidad en el tiempo, incluso después de la descongelación;

- Amplificación del efecto angiogénico de las células mediante preacondicionamiento hipódico.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación autóloga (A) sustancialmente libre de glóbulos rojos y empobrecida en neutrófilos, que comprende:

- a) Células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs),
- b) Dimetilsulfóxido (DMSO) en concentraciones comprendidas entre 0,3% y 1,3% (v/v),
- c) Plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B), con una concentración de plaquetas comprendida entre 700.000 plaquetas/ μ L y 1.200.000 plaquetas/ μ L; o concentrado de plaquetas (B'), que tiene una concentración de plaquetas comprendida entre 7.000.000 plaquetas/ μ L y 12.000.000 plaquetas/ μ L,

obteniéndose dicha preparación autóloga (A) con un proceso que comprende las siguientes etapas:

- i) Obtención, mediante el tratamiento de una muestra de sangre extraída del paciente, de PBMNCs autólogas y plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B'), respectivamente;
- ii) Adición de DMSO a las PBMNCs obtenidas en la etapa (i), en una concentración comprendida entre el 3% y el 5% (v/v) disuelto en una porción de plasma enriquecido en plaquetas (B) o del concentrado de plaquetas (B') preparados en etapa i) y obtención de un concentrado autólogo (C);
- iii) Congelación del concentrado autólogo (C) del punto ii) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B') tal como se obtuvo en la etapa i);
- iv) Envío del concentrado autólogo (C) y del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o del concentrado de plaquetas (B') de la etapa iii) al centro de salud deseado;
- v) Descongelación, en el momento de su uso, del concentrado autólogo (C) y el plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B) o el concentrado de plaquetas (B') del punto iv),

20 vi) Dilución, de 7 a 10 veces, del volumen de concentrado autólogo descongelado (C) con plasma autólogo descongelado (B) o concentrado de plaquetas descongelado (B') y obtención de la preparación autóloga (A),

25 en donde dicho concentrado autólogo (C) comprende células mononucleares (PBMNCs), no contiene glóbulos rojos, está empobrecido en neutrófilos y comprende dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración comprendida entre el 3% en volumen y el 5% en volumen basada en el volumen del concentrado autólogo (C).

2. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1, que contiene albúmina.

3. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1 o 2, en la que dichas células mononucleares de sangre periférica (PBMNCs) comprenden:

- TNCs comprendidas entre $1,26 \times 10^8$ y $1,89 \times 10^8$ ($6,3 \times 10^3$ y $9,45 \times 10^3$ células/ μ L),
- Linfocitos comprendidos entre $0,97 \times 10^8$ y $1,45 \times 10^8$ ($4,85 \times 10^3$ y $7,25 \times 10^3$ células/ μ L),
- Monocitos comprendidos entre $0,28 \times 10^8$ y $0,42 \times 10^8$ ($1,4 \times 10^3$ y $2,1 \times 10^3$ células/ μ L),
- MNCs comprendidas entre $1,25 \times 10^8$ y $1,87 \times 10^8$ ($6,25 \times 10^3$ y $9,35 \times 10^3$ células/ μ L).

4. Preparación autóloga (A) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el contenido de neutrófilos está comprendido entre $0,015 \times 10^8$ y $0,029 \times 10^8$ (75 y 145 células/ μ L).

35 5. Preparación autóloga (A) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.

6. Preparación autóloga (A) para su uso según la reivindicación 5, para el tratamiento de la enfermedad arterial periférica (EAP), la isquemia crítica de las extremidades (ICE) y el pie diabético.

7. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1, en la que dicho concentrado autólogo (C) comprende albúmina.

8. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1, en la que dicho concentrado autólogo (C) comprende:

- Células nucleadas totales (TNCs) comprendidas entre $10,5 \times 10^3/\mu$ L y $13,6 \times 10^3/\mu$ L,
- Linfocitos comprendidos entre $5,0 \times 10^3/\mu$ L y $7,0 \times 10^3/\mu$ L,
- Monocitos comprendidos entre $1,0 \times 10^3/\mu$ L y $2,0 \times 10^3/\mu$ L,
- Células mononucleares (MNCs) comprendidas entre $6,2 \times 10^3/\mu$ L y $9,3 \times 10^3/\mu$ L.

9. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1, en la que el contenido de neutrófilos en dicho concentrado autólogo (C) está comprendido entre $0,1 \times 10^3$ y $0,2 \times 10^3/\mu\text{L}$.
10. Preparación autóloga (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la etapa i), de preparar las células PBMNCs y el plasma (B) o el concentrado de plaquetas (B'), se logra mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:
- 5 I. Dilución volumétrica 1:1 de sangre extraída del paciente en un tampón biológicamente compatible y en presencia de un anticoagulante;
 - II. Carga, en proporción volumétrica 1:1, dentro de tubos con septum interno, de sangre proveniente de la etapa (I) y una solución de polímero en gradiente de densidad Ficoll;
 - 10 III. Centrifugación de los tubos de la etapa (II) a $1200 \times g$ durante 10 minutos, a temperatura ambiente y separación del sobrenadante formado por células mononucleares (PBMNCs) del plasma autólogo enriquecido en plaquetas (B);
 - IV. Lavado de las PBMNCs provenientes de la etapa (III) dos veces, con un sistema tampón biológicamente compatible, mediante centrifugación a $300 \times g$ durante 8 minutos;
 - 15 V. Opcionalmente, concentración del plasma autólogo (B) por centrifugación y separación de la fracción más pesada y obtención del concentrado de plaquetas (B').
11. Preparación autóloga (A) según la reivindicación 1, en la que en la etapa ii) se añade albúmina a las PBMNCs.
12. Preparación autóloga (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el concentrado autólogo (C) obtenido en el punto ii) se preacondiciona antes de la etapa de congelación del punto iii).
- 20 13. Preparación autóloga (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la etapa de congelación (iii) se lleva a cabo a -80°C .
14. Preparación autóloga (A) según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que en la etapa vi) el volumen inicial del concentrado autólogo (C) se diluye hasta 8 veces en plasma enriquecido en plaquetas (B) o concentrado de plaquetas (B').

25

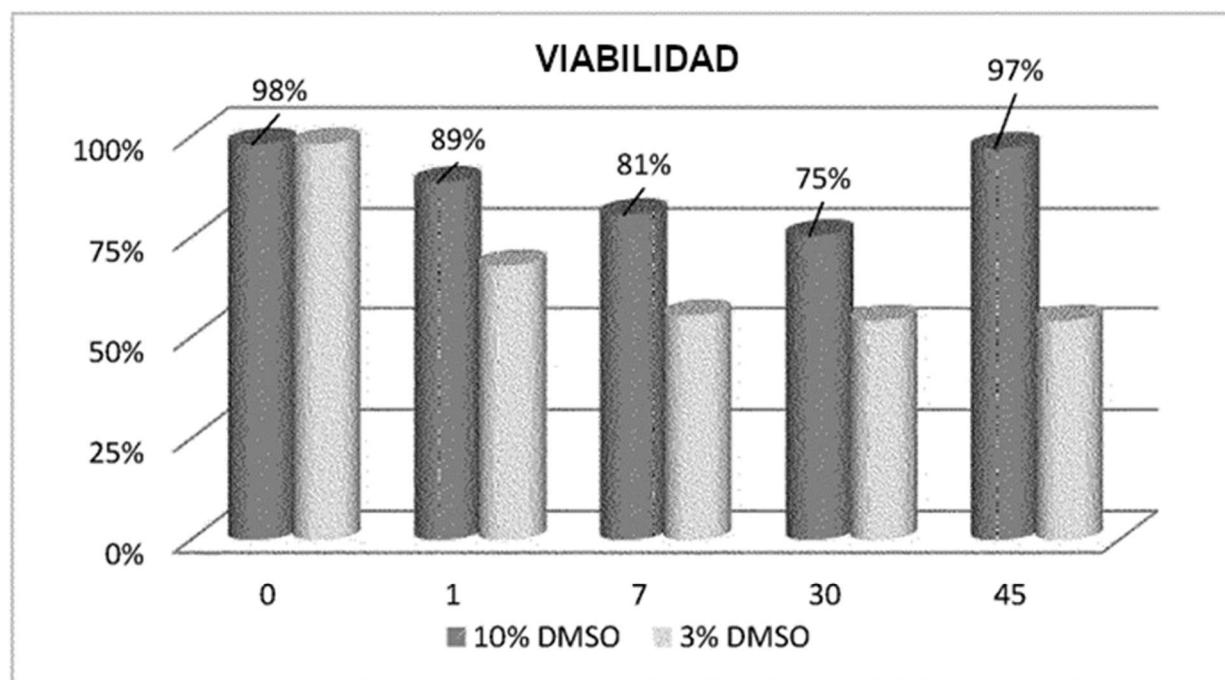


Figura 1

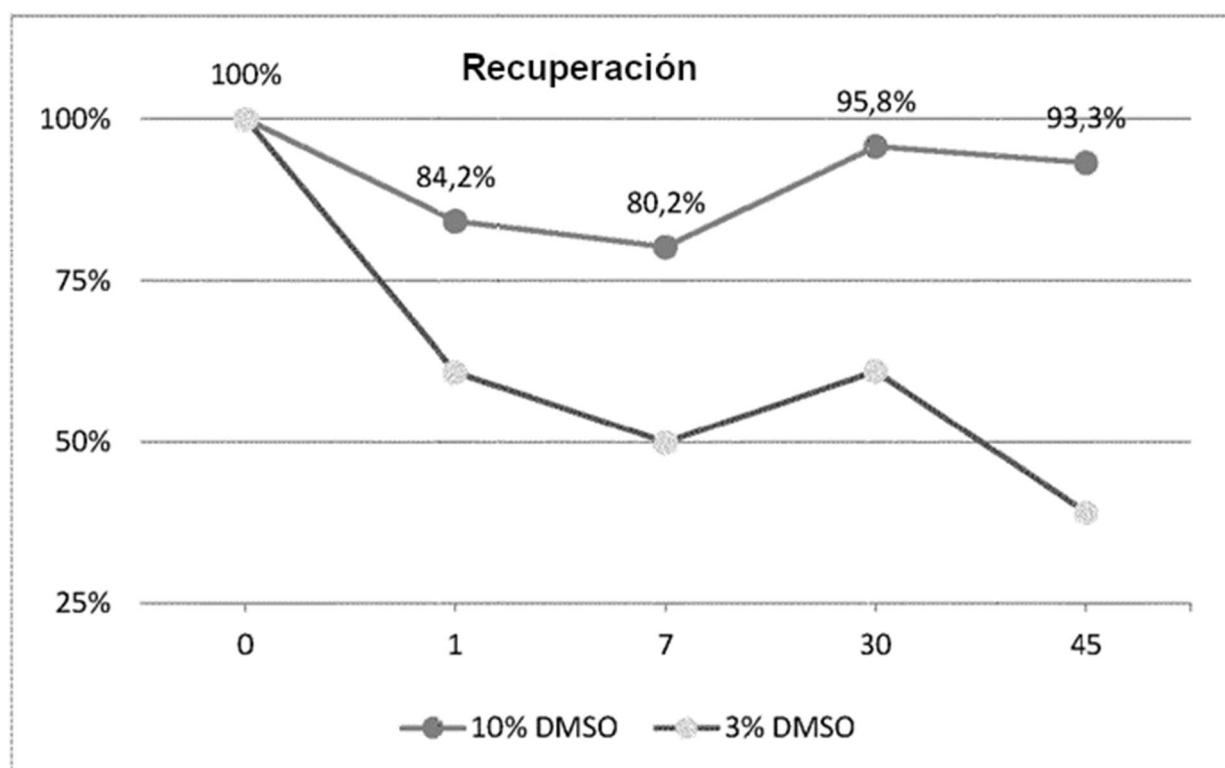
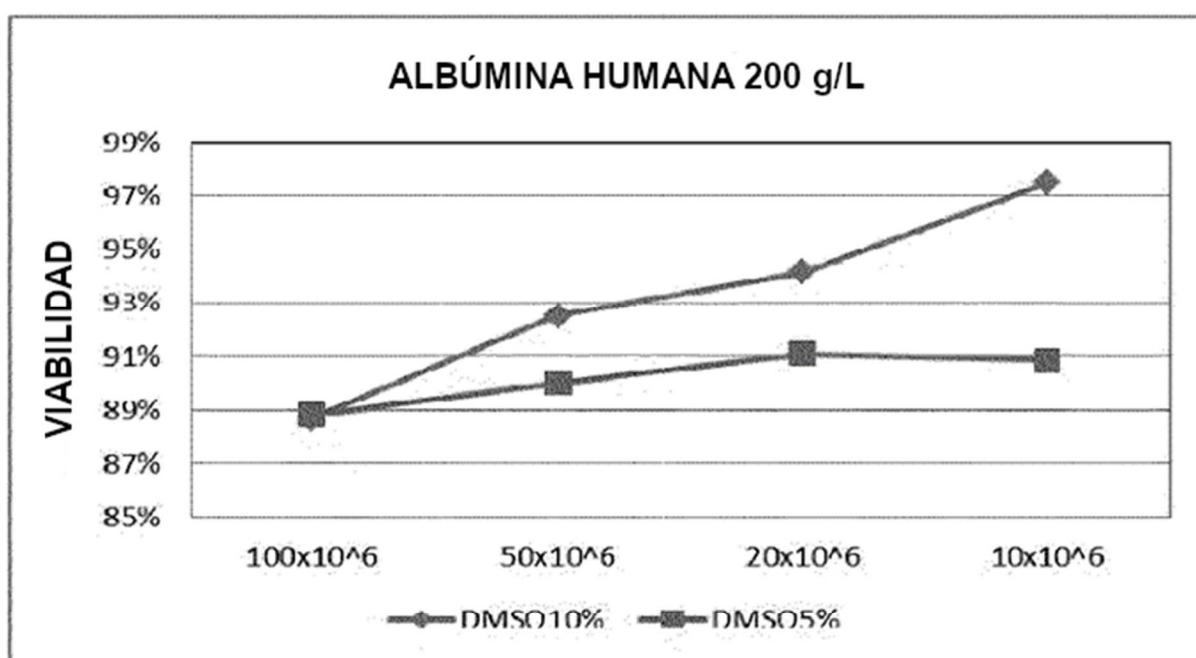
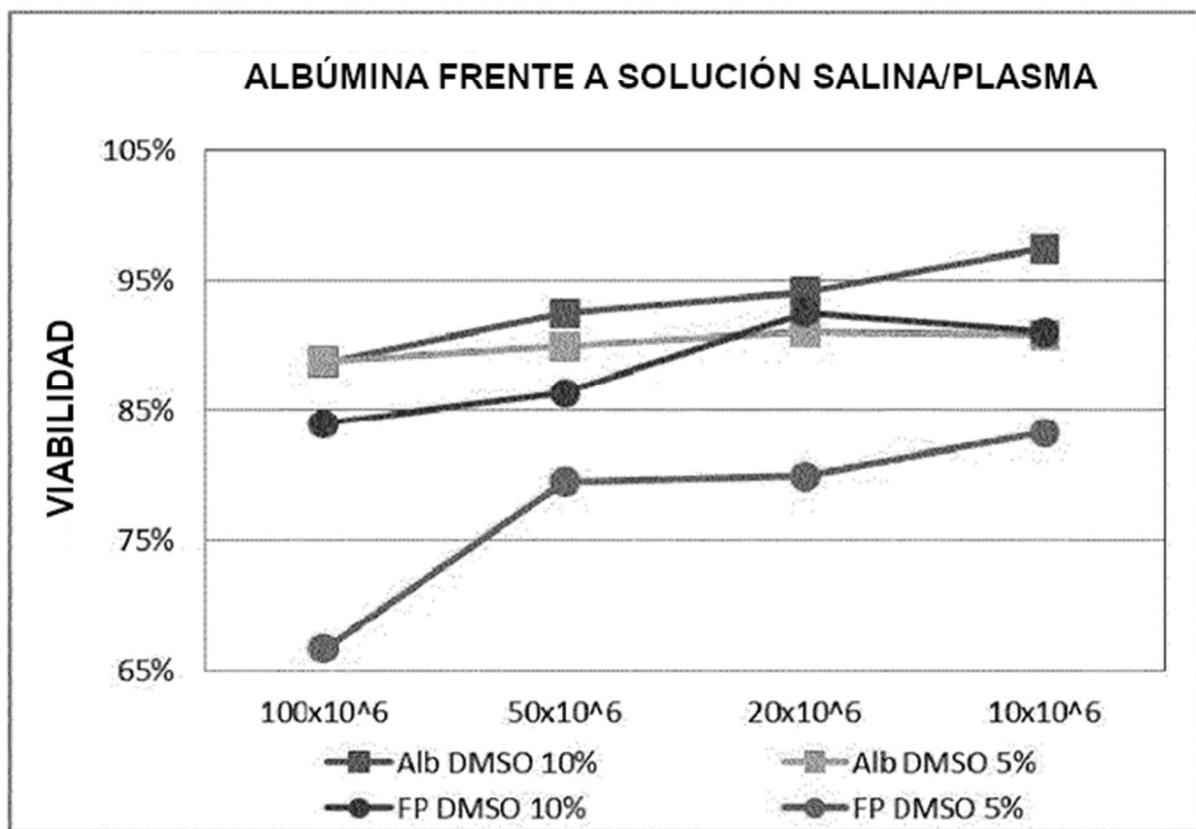
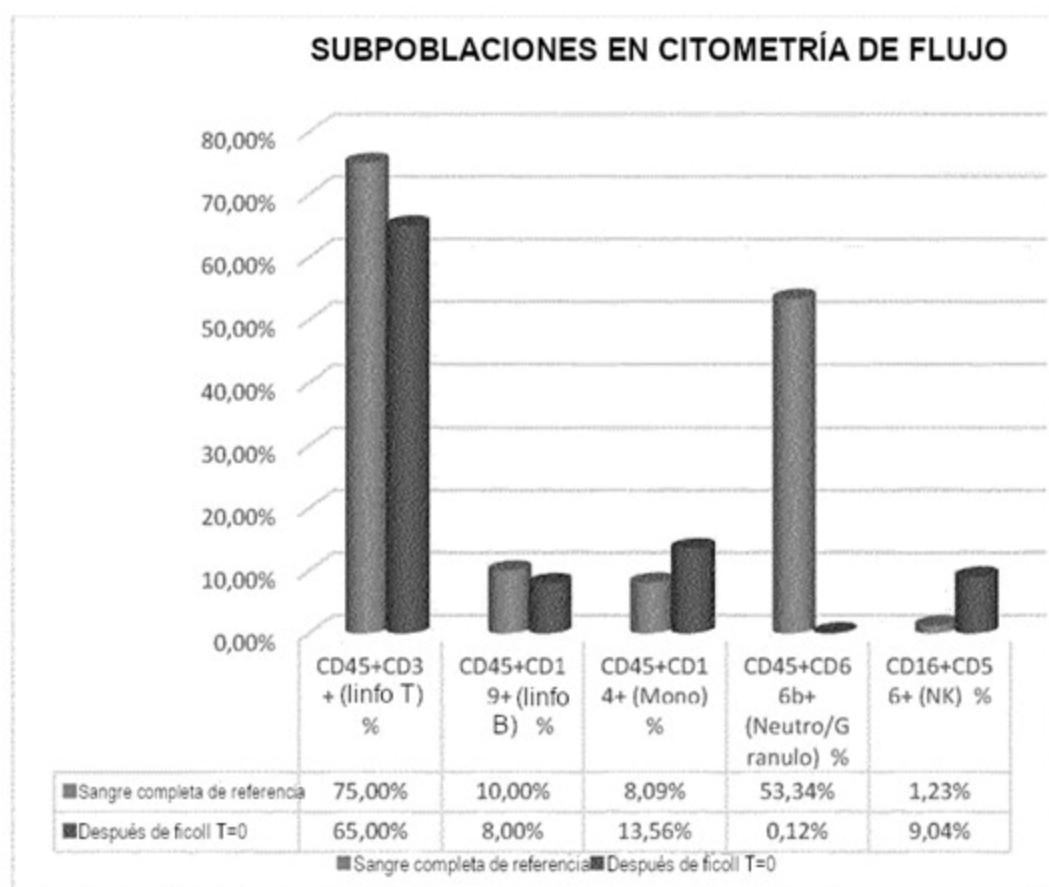
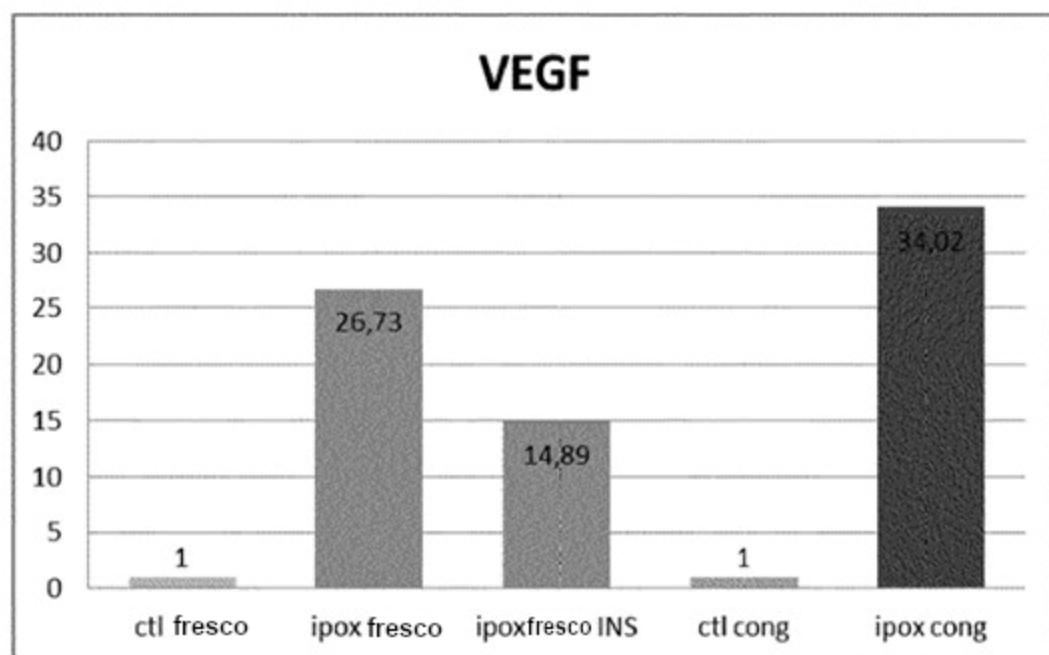


Figura 2

**Figura 3****Figura 4**

**Figura 5****Figura 6**