

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 203**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/51 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2018** **PCT/FR2018/050472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018** **WO18158542**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2018** **E 18712945 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022** **EP 3589298**

54 Título: **Células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton para el tratamiento de la sepsis**

30 Prioridad:

28.02.2017 FR 1751649

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2022

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LORRAINE (50.0%)
34 Cours Léopold CS 25233
54052 Nancy, FR y
CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL
UNIVERSITAIRE DE NANCY (50.0%)

72 Inventor/es:

BENSOUSSAN, DANIELE;
GIBOT, SÉBASTIEN;
REPPEL, LOÏC;
LAROYE, CAROLINE;
BOUFENZER, AMIR;
AVERCENC, LÉONORE y
HUSELSTEIN, CÉLINE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 927 203 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

Células madre mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton para el tratamiento de la sepsis

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a células madre mesenquimales humanas derivadas de la gelatina de Wharton, su método de preparación y sus usos terapéuticos.

Estado de la técnica

10 Aunque a menudo se malinterpreta, el choque séptico representa, junto con el infarto de miocardio, la undécima causa de muerte en todo el mundo. Primera causa de ingreso y mortalidad en unidades de reanimación no coronaria, su incidencia, entre 50 y 100 casos por 100.000 habitantes, ha seguido creciendo en los últimos años (Dombrovskiy et al., 2007). El aumento de la esperanza de vida, el aumento del número de bacterias multirresistentes y un diagnóstico más frecuente están en el origen de este fenómeno.

15 La fisiopatología del choque séptico es particularmente compleja (Iskander et al., 2013) e involucra simultáneamente citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, así como inmunoparálisis. El resultado es la falta de un tratamiento específico para el choque séptico debido a la incapacidad de las moléculas farmacéuticas convencionales para actuar tanto en el lado inflamatorio como en el lado antiinflamatorio, mientras se reactiva el sistema inmunológico.

20 Sin embargo, muchos estudios que utilizan modelos murinos de endotoxemia o peritonitis han demostrado la capacidad de las células madre mesenquimales (CSM) para reducir los niveles plasmáticos de IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-2 e IL-17 (Chao et al., 2014a; Kim et al., 2014; Luo et al., 2014; Pedrazza et al., 2014) y disminuir la concentración tisular de TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12 a nivel pulmonar, hepático e intestinal (Gonzalez-Rey et al., 2009), o en el nivel de líquido broncoalveolar (Mei et al., 2010a).

25 La capacidad de las CSM para limitar la migración tisular de neutrófilos contribuye a moderar los efectos nocivos de la inflamación en los tejidos (Rojas et al., 2014). Los estudios de secciones histológicas de ratones sometidos a sepsis polimicrobiana por ligadura y punción cecal (CLP) o sometidos a sepsis por endotoxemia muestran una disminución en la inflamación del tejido pulmonar y renal cuando se tratan con CSM (Krasnodembskaya et al., 2010). De manera similar, estos ratones muestran marcadores biológicos de funciones de órganos como amilasa en sangre, creatinina en sangre, bilirrubina en sangre, aspartato aminotransferasas (AST) y alanina aminotransferasas (ALT) significativamente mejores que los ratones tratados con solución salina (Luo et al., 2014; Pedrazza et al., 2014).

30 Además de su capacidad para limitar el daño tisular, las CSM pueden aumentar la eliminación de bacterias durante el choque séptico. De hecho, varios equipos han demostrado que la inyección de CSM en ratones sépticos condujo a una reducción de la bacteriemia al aumentar la actividad fagocítica de monocitos, macrófagos y neutrófilos, pero también mediante la síntesis y secreción por parte de las propias CSM de péptidos antibacterianos como LL-37 y hepcidina (Alcayaga-Miranda et al., 2015; Devaney et al., 2015; González Rey et al., 2009; Hall et al., 2013; Krasnodembskaya et al., 2010; Mayo et al., 2010b).

35 Además, las CSM tienen propiedades intrínsecas de "reubicación" que les confieren la susceptibilidad de migrar, según un gradiente de quimioquinas, hacia órganos lesionados tales como el hígado, los riñones y los pulmones. Esta capacidad de llegar a los tejidos dañados es una ventaja particularmente interesante de las CSM en el contexto de la patología de insuficiencia orgánica tal como el choque séptico (Wannemuehler et al., 2012).

40 Finalmente, la disminución del daño tisular por la inyección de CSM en modelos murinos con sepsis severa conduce a un aumento en la supervivencia. Numerosos estudios muestran una reducción significativa de la mortalidad de animales tratados pre o post sepsis con CSM (Alcayaga-Miranda et al., 2015; Devaney et al., 2015; Gonzalez-Rey et al., 2009; Krasnodembskaya et al., 2012; Luo et al., 2014; Németh et al., 2009). Por lo tanto, a través de su capacidad para regular la hiperinflamación y el daño tisular moderado, las CSM parecen ser capaces de mejorar significativamente la supervivencia posterior al choque séptico.

45 Hay tres fuentes principales de CSM: la médula ósea (BM), el tejido adiposo y la gelatina de Wharton (GW) del cordón umbilical. Frente a las CSM de MO, las CSM de GW obtenidas de forma sencilla, no invasiva y sin anestesia, permitirían democratizar la donación de CSM al evitar los riesgos asociados al muestreo de MO. Sin embargo, si las CMM de MO o las CSM de tejido adiposo se han estudiado en modelos animales de choque séptico, el potencial de las CSM de la gelatina de Wharton en esta indicación sigue estando mal documentado.

50 Hasta la fecha, solo 5 publicaciones han analizado el potencial terapéutico de las CSM-GW en el choque séptico utilizando un modelo murino de CLP Chao et al., 2014a; Condor et al., 2016; Wu et al., 2015; Zhao et al., 2014). Sin embargo, las células utilizadas en estos estudios son células frescas. Ningún estudio publicado hasta la fecha se refiere a CSM-GW descongeladas en la indicación de choque séptico, esto puede deberse al conocimiento general sobre el impacto de la congelación y descongelación en el potencial farmacológico e inmunomodulador de las células madre (François et al., Cytotherapy. 2012.14(2):147-52; Chinnadurai et al., 2016; Moll et al., 2016).

Además, Mezey y Nemeth (2015) describieron una disminución de las propiedades antibacterianas de las CSM cuando se inyectan tarde.

En consecuencia, hasta la fecha, estas limitaciones técnicas impiden el uso de CSM-GW en condiciones clínicas para el tratamiento terapéutico.

- 5 Contra todas las expectativas, los inventores de la presente invención muestran por primera vez que las CSM-GW descongeladas conservan su potencial terapéutico y pueden usarse en el tratamiento de la sepsis.

Resumen

- 10 La presente invención se refiere a células madre mesenquimales (CSM) humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso en el tratamiento de la sepsis, en particular el choque séptico; las dichas CSM humanas descongeladas de la gelatina de Wharton se caracterizan por que:

su nivel de expresión de CD44 es al menos un 20 % más bajo que el nivel de expresión de CD44 en las CSM humanas frescas obtenidas de la gelatina de Wharton; dónde

su nivel de CD90, CD73, CD105, CD146, CD166 o CFU-F es al menos un 10 % más bajo que el nivel de CD90, CD73, CD105, CD146 o CD166 respectivamente, en CSM humanas frescas obtenidas de la gelatina de Wharton.

- 15 En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD90, CD73, CD105, CD29, CD146, CD166, HLA-ABC es de al menos 10 % más bajo que el nivel de expresión del mismo marcador en CSM humanas frescas de la gelatina de Wharton.

- 20 En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende ACTB, ANXA1, CAPZB, LASP1, PRDX2, PRDX3, PSA3, RS12 y SYWC.

- 25 En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM no expresan sustancialmente al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende ACTS, ALIB1, ANX10, GBB1, GBB2, GPRIN1, DTNA, MIPO1, PSB3 y PSDE. En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM, en condiciones in vitro y/o en un estado no inflamatorio, secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7, IGFBP-1, insulina, FGF-7, NT-4 y VEGF-D.

- 30 En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM, en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria, secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7 y TGFβ3.

En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM, en condiciones in vivo y/o en un estado inflamatorio, no secretan sustancialmente IGFBP-1.

- 35 En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas células se derivan de tejido de cordón umbilical humano de una madre que responde a al menos uno de los siguientes criterios: haber recibido una administración de oxitocina durante el parto, haber dado a luz por trabajo de parto dirigido, haber dado a luz a término, no haber presentado preeclampsia durante el embarazo, cuyo hijo no presentó trastornos neonatales y habiendo tenido una impregnación tabáquica durante el embarazo.

- 40 En una realización, las CSM humanas descongeladas de gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas CSM son células de grado clínico.

En una realización, las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de la presente invención se caracterizan porque dichas células derivan directamente de la descongelación sin volver a cultivarse después de la descongelación.

- 45 La presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton de acuerdo con la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la sepsis.

Definiciones

En la presente invención, los siguientes términos se definen como sigue:

- 50 Se entiende por "ausencia de trastornos neonatales", el hecho de que un recién nacido no presente signos de prematuridad, retraso del crecimiento intrauterino o sufrimiento fetal. La prematuridad está determinada por el número de semanas de amenorrea. El retraso del crecimiento intrauterino está determinada por el peso al nacer, la altura al

nacer y el perímetro cefálico. El sufrimiento fetal está determinado por el pH arterial de la sangre del cordón y la puntuación de Apgar definida por A = apariencia (coloración), P = pulso, G = mueca (reflejos a los estímulos), A = actividad (tono muscular), R = respiración (esfuerzos respiratorios). Los umbrales de estos parámetros para determinar si un recién nacido no presenta trastornos neonatales son bien conocidos por el experto en la materia.

- 5 Se entiende por "parto a término", un parto que da a luz a un recién nacido con un peso al nacer superior a 3,2 kg, después de al menos 39,5 semanas de amenorrea y el peso de la placenta en el momento del parto es superior a 550 gramos.

Se entiende por "parto por trabajo dirigido", un parto asistido por la administración de oxitocina o la ruptura artificial de la bolsa de aguas.

- 10 Se entiende por "células de grado clínico", células que no han tenido contacto con una sustancia de origen animal no humano, como el suero animal no humano, durante el aislamiento, cultivo, criopreservación y descongelación de las células. Las células de grado clínico son células producidas en condiciones de cultivo compatibles con el uso en humanos y de acuerdo con las Buenas Prácticas de Producción Farmacéutica.

- 15 Se entiende por "células madre criopreservadas", células madre almacenadas a muy baja temperatura, preferiblemente entre -150°C y -196°C, preferiblemente en presencia de una solución crioprotectora que contiene dimetilsulfóxido (DMSO).

- 20 Se entiende por "células madre mesenquimales", células madre multipotentes, de origen mesodérmico, que se encuentran en diversos tejidos del cuerpo adulto tal como la médula ósea, el tejido adiposo, así como el cordón umbilical. Estas células estromales son capaces de autorrenovarse y diferenciarse en células de los linajes osteoblástico, condrocitos y adipocitos. al menos, incluyendo sin limitación hueso, cartílago, tejido adiposo y estroma de la médula, músculo liso, ligamentos y tendones.

Se entiende por "células madre mesenquimales humanas descongeladas", células madre mesenquimales aisladas de tejidos humanos y que han sido sometidas al proceso de descongelación de células madre criopreservadas.

- 25 Se entiende por "células madre mesenquimales humanas frescas", células madre mesenquimales aisladas de tejidos humanos y que no han sufrido ningún proceso de congelación-descongelación.

Se entiende por "Gelatina de Wharton", el tejido conjuntivo de origen mesoblástico extraembrionario, que envuelve las dos arterias umbilicales y la vena umbilical y protege así el cordón umbilical.

- 30 Se entiende por "sepsis", una infección general grave del cuerpo por gérmenes patógenos, en particular bacterias. La sepsis se define como una disfunción orgánica secundaria a una respuesta inadecuada del organismo a una infección. Según la gravedad, la sepsis se puede clasificar en dos órdenes: sepsis sentido estricto, y choque séptico (« The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) », JAMA. 2016;315(8):801-810). La sepsis, en su definición más estrecha, asocia clínicamente una infección con un puntaje SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score) ≥ 2 o un aumento en el puntaje SOFA mayor o igual a 2 puntos si hubo disfunción orgánica antes de la infección. El choque séptico, en cambio, asocia la sepsis a la necesidad de utilizar vasopresores qsp PAM [presión arterial media] ≥ 65 mmHg y/o una lactatemia > 2 mmol/L (es decir, 18 mg/dL), y ello, a pesar de un llenado vascular adecuado.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a células madre mesenquimales (CSM) para su uso en el tratamiento de la sepsis, en particular del choque séptico.

- 40 En una realización, las CSM son células madre animales, preferiblemente de mamífero, preferiblemente humanas. Según la presente invención, las CSM son células madre humanas.

En una realización, las CSM se derivan de la gelatina de Wharton, la médula ósea y/o el tejido adiposo. De acuerdo con la presente invención, las CSM se derivan de la gelatina de Wharton.

- 45 Según la presente invención, las CSM se descongelan, es decir, se han sometido a un proceso de congelación-descongelación.

Más particularmente, la presente invención por lo tanto se refiere a células madre mesenquimales humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton (CSM-GW) para su uso en el tratamiento de la sepsis, en particular el choque séptico.

- 50 De acuerdo con la presente invención, las CSM-GW descongeladas exhiben diferentes características fenotípicas de las CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque:

- al menos el 60% de las células expresan los siguientes antígenos: CD90, CD73, CD105, CD44; y
- al menos el 80% de las células no expresan ninguno de los siguientes marcadores: CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR; y
- al menos el 10% de las células expresan el marcador CD106.

5 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque:

- al menos el 60% de las células expresan los siguientes antígenos: CD90, CD73, CD105, CD44; y
- al menos el 80% de las células no expresan ninguno de los siguientes marcadores: CD34, CD11b, CD19, CD45, CD144, HLA-DR; y
- al menos el 10% de las células expresan el marcador CD106.

10 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión de CD44 es de al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos al menos el 45 %, al menos un 50 % o más inferior al nivel de expresión de CD44 en CSM-GW frescas.

Se entiende por "CD44", el receptor de hialuronano, un ejemplo del cual es la proteína CD44 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P16070.

15 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD90, CD73, CD105, CD29, CD146, CD166, HLA-ABC es de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por debajo del nivel de expresión del mismo marcador en CSM-GW frescas.

20 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD90 es de al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD90 en CSM-GW frescas.

Se entiende por "CD90", la glicoproteína de membrana Thy-1, un ejemplo de la cual es la proteína CD90 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P04216.

25 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD73 es de al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD73 en CSM-GW frescas.

30 Se entiende por "CD73", la enzima ecto-5'-nucleotidasa (o NT5E), un ejemplo de la cual es la proteína CD73 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P21589.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD105 es de al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD105 en CSM-GW frescas.

35 Se entiende por "CD105", la glicoproteína de membrana endoglina, un ejemplo de la cual es la proteína humana CD105 cuyo número de acceso UniProtKB es P17813.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD29 es de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD29 en CSM-GW frescas.

40

Se entiende por "CD29", la proteína integrina β -1, un ejemplo de la cual es la proteína CD29 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P05556.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD146 es de al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD146 en CSM-GW frescas.

45

Se entiende por "CD146", la molécula de adhesión celular del melanoma (en inglés, MCAM: Melanoma Cell Adhesion Molecule), un ejemplo de la cual es la proteína humana CD146 cuyo número de acceso UniProtKB es P43121.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD166 es de al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al

50

menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD166 en CSM-GW frescas.

Se entiende por “CD166”, la molécula de adhesión celular de los leucocitos activados (en inglés, ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule), un ejemplo de la cual es la proteína CD166 humana cuyo número de acceso UniProtKB es Q13740.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador HLA-ABC es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador HLA-ABC en CSM-GW frescas.

Se entiende por “HLA-ABC”, los receptores de superficie del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, un ejemplo del cual es el HLA-ABC humano cuyo número de acceso UniProtKB es O19689.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD13 y Sox-2 es de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por encima del nivel de expresión del mismo marcador en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD13 es de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por encima del nivel de expresión del marcador CD13 en CSM-GW frescas.

Se entiende por “CD13”, alanil aminopeptidasa de membrana, un ejemplo de la cual es la proteína CD13 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P15144.

En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador Sox-2 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por encima del nivel de expresión del marcador Sox-2 en CSM-GW frescas.

Se entiende por “Sox-2”, el factor de transcripción SRY-box 2, un ejemplo del cual es la proteína humana Sox-2 cuyo número de acceso UniProtKB es P48431.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD44 y SSEA-4 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por debajo del nivel de expresión del mismo marcador en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD44 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador CD44 en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador SSEA-4 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por debajo del nivel de expresión del marcador SSEA4 en MSCs -GW frescas.

Se entiende por “SSEA-4”, el gangliósido de membrana que consiste en un glicoesfingolípido que comprende un residuo de ácido siálico terminal (en inglés, Stage-Specific Embryonic Antigen 4).

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD90, CD166 y HLA-ABC es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por encima del nivel de expresión del mismo marcador en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD90 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por encima del nivel de expresión del marcador CD90 en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador CD166 es de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 % o más por encima del nivel de expresión del marcador CD166 en CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos un paso en subcultivo, se caracterizan porque el nivel de expresión del marcador HLA-ABC es de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o más por encima del nivel de expresión del marcador HLA-ABC en CSM-GW frescas.

5 En una realización, el nivel de expresión de los marcadores se mide mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, el nivel de expresión de los marcadores se mide mediante citometría de flujo. En una realización, el nivel de expresión de los marcadores se mide por la intensidad promedio de fluorescencia (en inglés, MFI: Mean Fluorescence Intensity).

10 En una realización, las CSM-GW descongeladas se caracterizan por una expresión de proteína diferencial en comparación con las CSM-GW frescas.

En una realización, las CSM-GW descongeladas expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTB (actina citoplasmática 1), ANXA1 (anexina A1), CAPZB (subunidad beta de la proteína protectora de actina F), LASP1 (LIM y proteína 1 del dominio SH3), PRDX2 (peroxirredoxina-2), PRDX3 (peróxido reductasa mitocondrial dependiente de tiorredoxina), PSA3 (proteasoma subunidad alfa tipo 3), RS12 (40S proteína ribosomal S12) y SYWC (triptófano citoplasmático-tARN ligasa).

15 En una realización, las CSM-GW frescas no expresan o sustancialmente no expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTB (actina citoplasmática 1), ANXA1 (anexina A1), CAPZB (subunidad beta de la proteína que protege la actina F), LASP1 (proteína 1 de dominio LIM y SH3), PRDX2 (peroxirredoxina-2), PRDX3 (peróxido reductasa mitocondrial dependiente de tiorredoxina), PSA3 (proteasoma subunidad alfa tipo 3), RS12 (proteína ribosómica 40S S12) y SYWC (proteasa citoplasmática triptófano-tARN ligasa).

20 En una realización, las CSM-GW descongeladas expresan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces más al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTB (actina 1 citoplasmática), ANXA1 (anexina A1), CAPZB (subunidad beta de la proteína que protege la actina F), LASP1 (proteína 1 de dominio LIM y SH3), PRDX2 (peroxirredoxina-2), PRDX3 (peróxido reductasa mitocondrial dependiente de tiorredoxina), PSA3 (proteasoma subunidad tipo alfa -3), RS12 (proteína ribosomal 40S S12) y SYWC (triptófano citoplasmático-tARN ligasa), que las CSM-GW frescas.

25 Se entiende por “ACTB”, la proteína actina citoplasmática 1 (en inglés, cytoplasmic actin 1), un ejemplo de lo cual es la ACTB humana cuyo número de registro de UniProtKB es P60709.

Se entiende por “ANXA1”, la proteína anexina 1 (en inglés, annexin A1), un ejemplo de lo cual es ANXA1 humano con número de acceso UniProtKB P04083.

Se entiende por “CAPZB”, la subunidad β de la proteína protectora de actina F (en inglés, F-actin-capping protein subunit beta), un ejemplo del cual es CAPZB humano con el número de registro P47756 de UniProtKB.

35 Se entiende por “LASP1”, la proteína 1 del dominio LIM y SH3 (en inglés, LIM and SH3 domain protein 1), un ejemplo de lo cual es LASP1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q14847.

Se entiende por “PRDX2”, peroxirredoxina 2 (en inglés, peroxiredoxin-2), un ejemplo del cual es el PRDX2 humano con el número de registro P32119 de UniProtKB.

40 Se entiende por “PRDX3”, peroxirredoxina 3 (en inglés, mitochondrial thioredoxin-dependent peroxide reductase), un ejemplo del cual es el PRDX3 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P30048.

Se entiende por “PSA3”, la subunidad α tipo 3 del proteasoma (en inglés, proteasome subunit alpha type-3), un ejemplo del cual es el PSA3 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P25788.

Se entiende por “RS12”, la proteína S12 de la subunidad 40S del ribosoma (en inglés, 40S ribosomal protein S12), un ejemplo del cual es el RS12 humano con el número de registro P25398 de UniProtKB.

45 Se entiende por “SYWC”, Triptofanil-tRNA sintetasa citoplasmática (en inglés, cytoplasmic tryptophan-tRNA ligase), un ejemplo de lo cual es SYWC humano cuyo número de acceso UniProtKB es P23381.

50 En una realización, las CSM-GW descongeladas no expresan o sustancialmente no expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTS (actina alfa del músculo esquelético), AL1B1 (aldehído deshidrogenasa X mitocondrial), ANX10 (anexina A10), GBB1 (proteína de unión a nucleótidos de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-1), GBB2 (proteína de unión a nucleótidos de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-2), GPRIN1 (Inductor regulado por proteína G del crecimiento de neuritas 1), DTNA (distrobrevina alfa), MIPO1 (proteína del gen 1 de la polidactilia con imagen especular), PSB3 (proteasoma subunidad beta tipo 3) y PSDE (Subunidad reguladora 14 no ATPasa del proteasoma 26S).

En una realización, las CSM-GW frescas expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTS (actina alfa del músculo esquelético), AL1B1 (aldehído deshidrogenasa X mitocondrial), ANX10 (anexina A10), GBB1 (proteína de unión al nucleótido de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-1), GBB2 (proteína de unión a nucleótidos de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-2), GPRIN1 (inductor regulado por proteína G del crecimiento de neuritas 1), DTNA (distribrevina alfa), MIPO1 (proteína del gen 1 de polidactilia con imagen especular), PSB3 (proteasoma subunidad beta tipo 3) y PSDE (Subunidad reguladora 14 no ATPasa del proteasoma 26S).

En una realización, las GW-CSM descongeladas expresan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces menos al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en ACTS (actina alfa del músculo esquelético), AL1B1 (aldehído deshidrogenasa X mitocondrial), ANX10 (anexina A10), GBB1 (proteína de unión a nucleótidos de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-1), GBB2 (proteína de unión a nucleótidos de guanina G(I)/G(S)/G(T) subunidad beta-2), GPRIN1 (inductor de crecimiento de neuritas regulado por proteína G 1), DTNA (distribrevina alfa), MIPO1 (proteína del gen 1 de polidactilia con imagen especular), PSB3 (proteasoma subunidad beta tipo 3) y PSDE (Subunidad reguladora 14 no ATPasa del proteasoma 26S), que las CSM-GW frescas.

Se entiende por "ACTS", la proteína α -actina del músculo esquelético (en inglés, skeletal muscle alpha actin), un ejemplo de la cual es el ACTS humano cuyo número de acceso UniProtKB es P68133.

Se entiende por "AL1B1", aldehído deshidrogenasa X mitocondrial (en inglés, mitochondrial aldehyde dehydrogenase X), un ejemplo de lo cual es AL1B1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P30837.

Se entiende por "ANX10", la proteína de la anexina A10 (en inglés, annexin A10), un ejemplo de la cual es el ANX10 humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q9UJ72.

Se entiende por "GBB1", la subunidad β 1 de la proteína de unión a guanina G(I)/G(S)/G(T) (en inglés, guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1), un ejemplo de la cual es el GBB1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P62873.

Se entiende por "GBB2", la subunidad β 2 de la proteína de unión a guanina G(I)/G(S)/G(T) (en inglés, guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2), un ejemplo de la cual es el GBB2 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P62879.

Se entiende por "GPRIN1", el inductor regulado por proteína G del crecimiento de neuritas 1 (en inglés, G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1), un ejemplo del cual es GPRIN1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q7Z2K8.

Se entiende por "DTNA", distribrevina α (en inglés, dystrobrevin alpha), un ejemplo de la cual es el DTNA humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q9Y4J8.

Se entiende por "MIPO1", la proteína del gen 1 de la polidactilia especular (en inglés, mirror-image polydactyly gene 1 protein), un ejemplo de la cual es MIPO1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q8TD10.

Se entiende por "PSB3", la subunidad β tipo 3 del proteasoma (en inglés, proteasome subunit beta type-3), un ejemplo de la cual es el PSB3 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P49720.

Se entiende por "PSDE", la subunidad reguladora no ATPasa 14 del proteasoma 26S (en inglés, 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14), un ejemplo de la cual es el PSDE humano cuyo número de acceso UniProtKB es O00487.

En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos 1 paso de subcultivo expresan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces más al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en AMPM2 (metionina aminopeptidasa 2), DJB11 (miembro 11 de la subfamilia B del homólogo de dnaJ), K1C18 (queratina, citoesquelético tipo I 18), K1C19 (queratina, citoesquelético tipo I 19), K2C8 (queratina citoesquelético tipo II 8), LYSC (lisozima C), PDIA3 (proteína disulfuro-isomerasa A3), TCTP (proteína tumoral controlada traslacionalmente) y TGM2 (proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa 2) que las CSM-GW frescas.

Se entiende por "AMPM2", metionil aminopeptidasa 2 (en inglés, methionine aminopeptidase 2), un ejemplo del cual es AMPM2 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P50579.

Se entiende por "DJB11", miembro 11 de la subfamilia B de homólogos de HSP40 (en inglés, dnaJ homolog subfamily B member 11), un ejemplo del cual es DJB11 humano cuyo número de acceso UniProtKB es Q9UBS4.

Se entiende por "K1C18", citoqueratina ácida tipo I 18 (en inglés, keratin, type I cytoskeletal 18), un ejemplo de la cual es el K1C18 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P05783.

Se entiende por "K1C19", citoqueratina ácida tipo I 19 (en inglés, keratin, type I cytoskeletal 19), un ejemplo de la cual es el K1C19 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P08727.

Se entiende por "K2C8", citoqueratina básica tipo II 8 (en inglés, keratin type II cytoskeletal 8), un ejemplo de la cual es el K2C8 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P05787.

- 5 Se entiende por "LYSC", lisozima C (en inglés, lysozyme C), un ejemplo de la cual es LYSC humano cuyo número de acceso UniProtKB es P61626.

Se entiende por "PDIA3", la enzima disulfuro isomerasa A3 (en inglés, protein disulfide-isomerase A3), un ejemplo de la cual es el PDIA3 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P30101.

- 10 Se entiende por "TCTP", la proteína tumoral controlada traslacional (en inglés, translationally-controlled tumor protein), un ejemplo de la cual es TCTP humano cuyo número de acceso UniProtKB es P13693.

Se entiende por "TGM2", la enzima γ -glutamyltranspeptidasa 2 (en inglés, protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2), un ejemplo de la cual es el TGM2 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P21980.

- 15 En una realización, las CSM-GW descongeladas después de al menos 1 paso de subcultivo expresan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces menos al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende o consiste en GSTP1 (glutathion S-transferasa P), HSP7C (proteína de 71 kDa afín al choque térmico), HSPB1 (proteína de choque térmico beta-1), LEG1 (galectina-1), S10AB (proteína S100-A11) y UBE2N (enzima conjugadora de ubiquitina E2 N), que las CSM-GW frescas.

- 20 Se entiende por "GSTP1", la enzima glutathion S-transferasa P (en inglés, glutathione S-transferase P), un ejemplo de lo cual es GSTP1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P09211.

Se entiende por "HSP7C", la proteína de choque térmico 73 (en inglés, heat shock cognate 71 kDa protein), un ejemplo de lo cual es HSP7C humano cuyo número de acceso UniProtKB es P11142.

- 25 Se entiende por "HSPB1", la proteína de choque térmico 27 (en inglés, heat shock protein beta-1), un ejemplo del cual es HSPB1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P04792.

Se entiende por "LEG1", galectina 1 (en inglés, galectin-1), un ejemplo del cual es LEG1 humano cuyo número de acceso UniProtKB es P09382.

Se entiende por "S10AB", la proteína S100-A11 (en inglés, protein S100-A11), un ejemplo del cual es el S10AB humano cuyo número de acceso UniProtKB es P31949.

- 30 Se entiende por "UBE2N", la enzima conjugadora de ubiquitina E2 N (en inglés, ubiquitin-conjugating enzyme E2 N), un ejemplo del cual es el UBE2N humano cuyo número de acceso UniProtKB es P61088.

En una realización, la expresión de la proteína se mide mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, la expresión de proteínas se mide mediante espectrometría de masas.

- 35 En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en un estado no inflamatorio secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7, IGFBP-1, insulina, FGF-7, NT-4 y VEGF-D.

- 40 En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces más al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7, IGFBP-1, insulina, FGF-7, NT-4 y VEGF-D, que CSM-GW fresco, en condiciones in vitro y/o en una condición no inflamatoria.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 50 pg/mL, al menos 100 pg/mL, al menos 150 pg/mL, al menos 200 pg/mL, al menos 250 pg/mL, al menos 300 pg/mL, al menos 350 pg/ml, al menos 400 pg/ml, al menos 450 pg/ml, al menos 500 pg/ml o más de BMP-7.

- 45 En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 20 pg/mL, al menos 25 pg/mL, al menos 30 pg/mL, al menos 35 pg/mL, al menos 40 pg/mL, al menos 45 pg/mL, al menos 50 pg/ml, al menos 55 pg/ml, al menos 60 pg/ml, al menos 65 pg/ml o más de IGFBP-1.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 50 pg/mL, al menos 75 pg/mL, al menos 100 pg/mL, al menos 125 pg/mL, al menos 150 pg/mL, al menos 175 pg/mL, al menos 200 pg/mL, al menos 225 pg/mL, al menos 250 pg/mL, al menos 275 pg/mL o más de insulina.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 10 pg/mL, al menos 15 pg/mL, al menos 20 pg/mL, al menos 25 pg/mL, al menos 30 pg/mL, al menos 35 pg/mL, al menos 40 pg/ml, al menos 45 pg/ml, al menos 50 pg/ml, al menos 55 pg/ml, al menos 60 pg/ml, al menos 65 pg/ml o más de FGF-7.

- 5 En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 45 pg/mL, al menos 50 pg/mL, al menos 55 pg/mL, al menos 60 pg/mL, al menos 65 pg/mL, al menos 70 pg/mL, al menos 75 pg/mL, al menos 80 pg/mL, al menos 85 pg/mL, al menos 90 pg/mL o más de NT-4.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vitro y/o en condiciones no inflamatorias secretan al menos 5 pg/mL, al menos 10 pg/mL, al menos 15 pg/mL, al menos 20 pg/mL, al menos 25 pg/mL, al menos 30 pg/mL, al menos 35 pg/ml, al menos 40 pg/ml, al menos 45 pg/ml, al menos 50 pg/ml o más de VEGF-D.

- 10

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en un estado inflamatorio secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7 y TGFβ3.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en estados inflamatorios secretan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces más de al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7 y TGFβ3, que CSM-GW fresco, en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria.

- 15

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria secretan al menos 200 pg/mL, al menos 250 pg/mL, al menos 300 pg/mL, al menos 350 pg/mL, al menos 400 pg/mL, al menos 450 pg/mL, al menos al menos 500 pg/mL, al menos 550 pg/mL, al menos 600 pg/mL, al menos 650 pg/mL, al menos 700 pg/mL, al menos 750 pg/mL o más de BMP-7.

- 20

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria secretan al menos 20 pg/mL, al menos 25 pg/mL, al menos 30 pg/mL, al menos 35 pg/mL, al menos 40 pg/mL, al menos 45 pg/mL, al menos al menos 50 pg/mL, al menos 55 pg/mL, al menos 60 pg/mL, al menos 65 pg/mL o más TGFβ3.

- 25 En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en un estado inflamatorio no secretan o sustancialmente no secretan IGFBP-1.

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en estados inflamatorios secretan al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3,0 veces, 3,5 veces, 4,0 veces, 4,5 veces, 5,0 veces, 7,5 veces, 10,0 veces, 15,0 veces, 20,0 veces, 30,0 veces, 40,0 veces, 50,0 veces menos IGFBP-1 que CSM-GW frescas, en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria.

- 30

En una realización, las CSM-GW descongeladas en condiciones in vivo y/o en una condición inflamatoria secretan menos de 20 pg/mL, al menos 15 pg/mL, al menos 10 pg/mL, al menos 5 pg/mL, al menos 4 pg/mL, al menos 3 pg/mL, al menos 2 pg/mL, al menos 1 pg/mL o menos IGFBP-1.

Se entiende por "BMP-7", la proteína morfogenética ósea 7 (en inglés, Bone Morphogenetic Protein 7). Un ejemplo de BMP-7 corresponde a la proteína BMP-7 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P18075.

- 35

Se entiende por "IGFBP-1", proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (en inglés, Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 1). Un ejemplo de IGFBP-1 corresponde a la proteína IGFBP-1 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P08833.

Se entiende por "insulina", la hormona proteica que favorece la absorción de la glucosa en sangre. Un ejemplo de insulina corresponde a la insulina humana cuyo número de acceso UniProtKB es P01308.

- 40

Se entiende por "FGF-7", el factor de crecimiento de fibroblastos 7 (en inglés, Fibroblast Growth Factor 7). Un ejemplo de FGF-7 corresponde a la proteína FGF-7 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P21781.

Se entiende por "NT-4", neurotrofina 4. Un ejemplo de NT-4 es la proteína NT-4 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P34130.

- 45 Se entiende por "VEGF-D", el factor de crecimiento endotelial vascular D (en inglés, Vascular Endothelial Growth Factor D). Un ejemplo de VEGF-D corresponde a la proteína VEGF-D humana cuyo número de acceso UniProtKB es O43915.

Se entiende por "TGFβ3", el factor de crecimiento transformante β3 (en inglés, Transforming Growth Factor β3). Un ejemplo de TGFβ3 corresponde a la proteína TGFβ3 humana cuyo número de acceso UniProtKB es P10600.

- 50 Se entiende por "condición in vitro", una condición en la que las CSM-GW descongeladas están fuera de un organismo vivo, preferiblemente fuera del paciente.

Se entiende por "condición in vivo", una condición en la que las CSM-GW descongeladas están dentro de un organismo vivo, preferiblemente dentro del paciente, es decir, después de la administración al paciente.

Se entiende por "condición no inflamatoria", una condición en la que las CSM-GW descongeladas no se estimulan, in vitro o in vivo, por citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α e IFN- γ . Específicamente, una condición no inflamatoria se puede definir como una condición in vivo, preferiblemente dentro del paciente, siendo dicho paciente sano o sustancialmente sano, es decir, dicho paciente no está afectado por sepsis.

Se entiende por "condición inflamatoria", una condición en la que se estimulan las CSM-GW descongeladas, in vitro o in vivo, por citoquinas inflamatorias, incluyendo TNF- α e IFN- γ . Específicamente, una condición inflamatoria se puede definir como una condición in vivo, preferentemente en el interior del paciente, estando afectado dicho paciente por sepsis.

En una realización, las CSM-GW se almacenan a muy baja temperatura. En una realización, las CSM-GW se almacenan a alrededor de -20 °C, preferiblemente a alrededor de -80 °C, preferiblemente entre -150 °C y -196 °C. En una realización, las CSM-GW se almacenan en presencia de una solución crioprotectora. Las soluciones crioprotectoras de células son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales soluciones incluyen, p.ej., En una realización, la solución crioprotectora comprende al menos un crioprotector seleccionado de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etilenglicol, propilenglicol, formamida, butenodiol y una mezcla de los mismos.

En una realización, las CSM-GW se descongelan según un protocolo de descongelación convencional. A modo de ejemplo, las CSM-GW se descongelan en un baño de agua a 37°C y luego se lavan en presencia de una solución de lavado que comprende NaCl, albúmina y citrato dextrosa fórmula A (ACD).

Una realización particular de la invención se refiere a CSM-GW descongeladas como se ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento del choque séptico, la forma más grave de sepsis, que se define por la aparición o persistencia de hipotensión arterial y/o signos de hipoperfusión periférica. a pesar de un llenado vascular adecuado.

En una realización ventajosa, las CSM-GW utilizadas en la invención proceden directamente de la descongelación, sin recultivar tras la descongelación.

A diferencia de estudios previos, en los que las células analizadas son células frescas, que no han sido sometidas a congelación ni descongelación, y administradas en tiempos precoces en animales en un modelo de choque séptico, los resultados de la presente invención aportan por primera vez la prueba de la eficacia de CSM-GW en condiciones compatibles con las condiciones clínicas, a saber, la administración de CSM-GW descongeladas en una etapa tardía de la evolución de la sepsis.

La presente invención demuestra que las CSM-GW descongeladas conservan las propiedades inmunomoduladoras y antibacterianas a un nivel comparable al de las CSM descongeladas aisladas a partir de médula ósea (CSM-MO) descongelada y que la administración de CSM-GW permite incluso aumentar la supervivencia de ratones que sufrían choque séptico en comparación con la supervivencia de ratones tratados con CSM-MO.

Estos resultados muestran que las CSM-GW descongeladas son adecuadas para uso inmediato en condiciones clínicas para el tratamiento del choque séptico.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se lavan después de descongelarlos. En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se vuelven a suspender después de descongelarlos. En una realización, las CSM-GW usadas en la invención se resuspenden después de descongelarlos en una solución de hidroxietilalmidón. En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se resuspenden después de descongelarlas en una solución de albúmina. En una realización, la solución de albúmina es una solución de albúmina al 4%. En una realización, la solución de albúmina comprende además NaCl y/o citrato dextrosa fórmula A (ACD).

En la presente divulgación, los inventores también observan por primera vez una correlación significativa entre los factores obstétricos por un lado y la proliferación de CSM-GW por otro lado y proporcionan los criterios para la elección de los cordones umbilicales para obtener CSM-GW que tienen una mejor capacidad proliferativa.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la presente invención derivan de tejido de cordón umbilical humano que cumple estos criterios.

Se observa que estos criterios mejoran la proliferación celular reduciendo el tiempo de duplicación del número de células, en particular en el paso P1. Estos criterios también permiten obtener un mayor número de células con un breve tiempo de duplicación.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la presente invención se derivan del tejido del cordón umbilical humano de una madre que cumple al menos uno de los siguientes criterios: haber recibido una administración de oxitocina durante el parto, haber dado a luz mediante trabajo de parto controlado, haber dado a luz nacido a término, no haber presentado preeclampsia durante el embarazo, cuyo hijo no presentó trastornos neonatales y habiendo tenido una impregnación tabáquica durante el embarazo.

Los inventores han observado que estos factores obstétricos tienen un impacto positivo en la proliferación celular de CSM-GW y permiten seleccionar CSM-GW con mejores propiedades de proliferación.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la presente invención son células de grado clínico.

- 5 Por lo tanto, cualquier medio de cultivo y reactivo utilizado está libre de material de origen animal no humano. En una realización, cualquier medio de cultivo y reactivo utilizados están libres de suero de origen animal no humano. En una realización, cualquier medio de cultivo y reactivo utilizado está libre de suero de cualquier origen, incluso humano.

Ventajosamente, el medio de cultivo utilizado para la adhesión celular contiene lisado de plaquetas humanas.

Un objeto de la presente invención también es una composición que comprende CSM-GW descongeladas como se describe anteriormente, para su uso en el tratamiento de la sepsis.

- 10 También es objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende, como principios activos, CSM-GW descongelada de grado clínico como se ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de la sepsis.

Dicha composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 En el contexto de la presente divulgación, un excipiente farmacéuticamente aceptable es un excipiente libre de material de origen animal no humano y adecuado para uso en contacto con las células de individuos humanos sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebida. El experto en la materia sabrá elegir un excipiente farmacéuticamente aceptable según la formulación galénica de la composición y su modo de administración.

A modo de ejemplo, dicho excipiente es albúmina al 4% o una solución de hidroxietilalmidón (HEA) 130/0,42.

Dicha composición farmacéutica puede presentarse en forma de producto de infusión y envasarse en una bolsa de infusión.

- 20 También se describe en esta descripción un medicamento que comprende CSM-GW descongeladas como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de la sepsis.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente de forma sistémica o local.

- 25 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención pueden administrarse al paciente por vía intravenosa, intravascular, intracerebral, parenteral, intraperitoneal, epidural, intraespinal, intrasternal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraarterial, intracardiaca o intramuscular.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención pueden administrarse al paciente mediante inyección en bolo (también denominada inyección rápida) o mediante infusión continua (también denominada inyección lenta).

- 30 En una realización preferida, las CSM-GW descongeladas de calidad clínica para su uso en el tratamiento de la sepsis se administran por vía intravenosa.

En una realización, las CSM-GW descongeladas de grado clínico descritas anteriormente se pueden administrar a un paciente con sepsis a una dosis de aproximadamente $0,3 \times 10^6$ en 3×10^6 células por kg de peso corporal, especialmente una dosis de 1×10^6 células por kg de peso. El experto en la materia puede ajustar la dosis según la gravedad de la infección, el peso del paciente, el número o la frecuencia de las administraciones.

- 35 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente en una dosis que oscila entre 10^3 A las 10^9 CSM/kg, preferiblemente 10^4 A las 10^8 CSM/kg, preferiblemente 10^5 A las 10^7 CSM/kg.

- 40 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente a una dosis de 1×10^5 CSM/kg, 2×10^5 CSM/kg, 3×10^5 CSM/kg, 4×10^5 CSM/kg, 5×10^5 CSM/kg, 6×10^5 CSM/kg, 7×10^5 CSM/kg, 8×10^5 CSM/kg, 9×10^5 CSM/kg, 1×10^6 CSM/kg, 2×10^6 CSM/kg, 3×10^6 CSM/kg, 4×10^6 CSM/kg, 5×10^6 CSM/kg, 6×10^6 CSM/kg, 7×10^6 CSM/kg, 8×10^6 CSM/kg, 9×10^6 CSM/kg, 1×10^7 CSM/kg.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente en una dosis que oscila entre 10^3 A las 10^9 CSM/kg/día, preferiblemente 10^4 a 10^8 CSM/kg/día, preferiblemente 10^5 a 10^7 CSM/kg/día.

- 45 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente a una dosis de 1×10^5 CSM/kg/día, 2×10^5 CSM/kg/día, 3×10^5 CSM/kg/día, 4×10^5 CSM/kg/día, 5×10^5 CSM/kg/día, 6×10^5 CSM/kg/día, 7×10^5 CSM/kg/día, 8×10^5 CSM/kg/día, 9×10^5 CSM/kg/día, 1×10^6 CSM/kg/día, 2×10^6 CSM/kg/día, 3×10^6 CSM/kg/día, 4×10^6 CSM/kg/día, 5×10^6 CSM/kg/día, 6×10^6 CSM/kg/día, 7×10^6 CSM/kg/día, 8×10^6 CSM/kg/día, 9×10^6 CSM/kg/día, 1×10^7 CSM/kg/día.

En una realización, las CSM CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente en una dosis que oscila entre 10^3 a 10^9 CSM/día, preferiblemente 10^4 a 10^8 CSM/día, preferiblemente 10^5 a 10^7 CSM/día.

En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar al paciente a una dosis de 1×10^5 CSM/kg/día, 2×10^5 CSM/día, 3×10^5 CSM/día, 4×10^5 CSM/día, 5×10^5 CSM/día, 6×10^5 CSM/día, 7×10^5 CSM/día, 8×10^5 CSM/día, 9×10^5 CSM/día, 1×10^6 CSM/día, 2×10^6 CSM/día, 3×10^6 CSM/día, 4×10^6 CSM/día, 5×10^6 CSM/día, 6×10^6 CSM/día, 7×10^6 CSM/día, 8×10^6 CSM/día, 9×10^6 CSM/día, 1×10^7 CSM/día.

- 5 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar en una sola dosis o en múltiples dosis espaciadas en el tiempo.

En una realización, las CSM-GW usadas en la invención se pueden administrar una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o más.

- 10 En una realización, las CSM-GW utilizadas en la invención se pueden administrar diariamente, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días.

En una realización, las CSM-GW usadas en la invención se pueden administrar una vez por semana, semanalmente, cada 2 semanas, cada 3 semanas.

En una realización, las CSM-GW usadas en la invención se pueden administrar una vez por mes, todos los meses, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses o más.

- 15 De acuerdo con la invención, las CSM-GW descongeladas descritas anteriormente se pueden diluir antes de su uso en un excipiente adecuado, por ejemplo, una solución de albúmina al 4% (4 g/100 ml) o una solución de hidroxietilalmidón (HEA) 130/0,42.

Las CSM-GW descongeladas para el tratamiento de la sepsis según la presente invención pueden usarse solas, o antes, durante o después de otro tratamiento para la sepsis, en particular un tratamiento con antibióticos.

- 20 En una realización, los tratamientos para la sepsis son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen terapia con antibióticos, terapia antifúngica, terapia con fluidos, administración de agentes vasopresores y terapia con corticosteroides.

En una realización ventajosa, las CSM-GW de calidad clínica descongeladas para uso en el tratamiento de la sepsis se administran a pacientes que padecen sepsis bajo tratamiento con antibióticos.

- 25 En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos un antibiótico. En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos dos antibióticos. En una realización, el paciente está en tratamiento con al menos 3 o más antibióticos.

Los ejemplos de antibióticos para el tratamiento de la sepsis incluyen ampicilina, azitromicina, aztreonam, cefazolina, cefepima, clindamicina, levofloxacina, linezolid, meropenem, metronidazol, piperacilina, tazobactam, tobramicina y vancomicina.

- 30

En una realización, las CSM-GW de grado clínico descongeladas para uso en el tratamiento de la sepsis se administran a pacientes que padecen sepsis bajo tratamiento con antifúngicos.

En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos un antifúngico. En una realización, el paciente está en tratamiento con al menos dos antifúngicos. En una realización, el paciente está en tratamiento con al menos 3 o más antifúngicos.

- 35

Los ejemplos de antifúngicos para el tratamiento de la sepsis incluyen anfotericina B desoxicolato, anidulafungina, caspofungina, fluconazol, itraconazol, micafungina y voriconazol.

En una realización, las CSM-GW descongeladas de calidad clínica para su uso en el tratamiento de la sepsis se administran en pacientes que padecen sepsis bajo reemplazo vascular.

- 40 El reemplazo vascular puede corregir la hipovolemia, mantener la presión arterial media por encima de 65 mmHg y limitar los signos clínicos de hipoperfusión al restaurar el volumen intravascular. El llenado vascular se realiza por medio de solutos.

Los ejemplos de fluidos para la reposición de fluidos en el tratamiento de la sepsis incluyen coloides y cristaloides.

- 45 En una realización, las CSM-GW descongeladas de grado clínico para uso en el tratamiento de la sepsis se administran a pacientes que padecen sepsis bajo tratamiento con agentes vasopresores.

En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos un agente vasopresor. En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos dos agentes vasopresores. En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos 3 o más agentes vasopresores.

- 50 Los ejemplos de agentes vasopresores para el tratamiento de la sepsis incluyen catecolaminas (incluye norepinefrina y adrenalina) y vasopresina.

En una realización, las CSM-GW de grado clínico descongeladas para uso en el tratamiento de la sepsis se administran a pacientes con sepsis que se someten a terapia con corticosteroides.

En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos un corticosteroide. En una realización, el paciente está bajo tratamiento con al menos dos corticosteroides. En una realización, el paciente está en tratamiento con al menos 3 o más corticosteroides.

Los ejemplos de corticosteroides para el tratamiento de la sepsis incluyen cortisona, hidrocortisona y prednisona.

Otros tratamientos son adecuados para la sepsis y son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de dichos tratamientos incluyen AB103, fosfatasa alcalina recombinante recAP, CaCP29, drotrecogina alfa activada, EA-230, eritoran, esmolol, GM-CSF, IFN γ , lenercept, levosimendan, LR12, selepresina, talactoferrina alfa y trombomodulina humana recombinante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención se ilustra con más detalle en las figuras y los ejemplos que se describen a continuación.

Figuras 1A y 1B : estas figuras representan respectivamente el número medio de UFC en anaeróbico (Figura 1A) o en aeróbico (Figura 1B) por miligramo de sangre. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. n=7-12 ratones por grupo. *p<0,05 CSM frente a PBS.

Figura 2A y 2B: estas figuras representan respectivamente el número de CFU en anaeróbico (figura 2A) o en aeróbico (figura 2B) por ml de sangre. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. n=7-12 ratones por grupo. *p<0,05 CSM versus PBS.

Figuras 3A, 3B, 3C, 3D: estas figuras representan respectivamente la cinética de los neutrófilos en el pulmón (Figura 3A), el bazo (Figura 3B), el hígado (Figura 3C), el fémur (Figura 3D). Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. n=4-6 ratones por grupo. *p<0,05 CSM frente a PBS; **p<0,01 CSM frente a PBS; ***p<0,001 CSM versus PBS.

Figura 4A, 4B, 4C, 4D: estas figuras representan respectivamente la cinética de los monocitos en el pulmón (FIG. 4A), el fémur (FIG. 4B), o de los monocitos inflamatorios en el pulmón (FIG. 4C), el fémur (FIG. 4D). Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM. n=4-6 ratones por grupo. *p<0,05 CSM frente a PBS; **p<0,01 CSM frente a PBS; ###p<0,01 CSM-MO versus CSM-GW.

Figura 5 : esta figura muestra la tasa de supervivencia después de la ligadura y perforación del ciego de ratones tratados con CSM-GW, CSM-MO, y ratones no tratados. Los resultados se presentan en forma de curvas de Kaplan-Meier. n=18-25 ratones por grupo. *p<0,05 CSM versus PBS.

Figuras 6A, 6B, 6C, 6D, 6E, 6F, 6G, 6H: estas figuras muestran el impacto del tratamiento con CSM-GW sobre la sepsis en cerdos en comparación con cerdos sin tratamiento. La Figura 6A compara la saturación venosa de oxígeno en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (**p<0,01 CSM-GW versus control). La figura 6B compara la disminución de la presión arterial media en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (**p<0,01 CSM-GW versus control). La Figura 6C compara el nivel de norepinefrina administrado en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (****p<0,0001 CSM-GW versus control). La Figura 6D compara el nivel de creatinina plasmática en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (**p<0,01 CSM-GW versus control). La Figura 6E compara la producción de orina en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento. La figura 6F compara el nivel de lactato en sangre en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (**p<0,01 CSM-GW versus control). La Figura 6G compara la relación PaO $_2$ /FiO $_2$ en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento (*p<0,5 CSM-GW versus control). La figura 6H compara la supervivencia de los animales en función del tiempo en el grupo con tratamiento CSM-GW y en el grupo sin tratamiento.

Figuras 7A, 7B: estas figuras muestran el impacto de los factores obstétricos sobre la proliferación celular (FIGS. 7A y 7B). El tiempo de duplicación es inversamente proporcional a la proliferación. *: p $\leq$ 0.05 en regresión bivariada, **: p $\leq$ 0.05 en regresión multivariante.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de CSM-GW

Aislamiento de CSM-GW

Los cordones umbilicales humanos se recogen en el Hospital de Maternidad de Nancy después de informar a las madres donantes y obtener su consentimiento por escrito. Los cordones se colocan en un medio de muestreo y se almacenan a 4°C. El medio de muestreo, colocado en una caja estéril (por ejemplo, Cryokits, Verreries Talançonnaises), está compuesto por tampón de fosfato salino (PBS, Macopharma, BC0120020) para asegurar un pH

cercano a 7, heparina para evitar la coagulación de la sangre residual, un antibiótico (gentamicina). El cordón se puede almacenar durante 24 horas a 4 °C en el medio de transporte después del muestreo.

- 5 Una vez recibidos, los cordones umbilicales se sumergen durante una hora a temperatura ambiente en una solución antibiótico-antifúngica compuesta por gentamicina, amoxicilina, vancomicina y anfotericina B en medio de cultivo α -MEM grado clínico (Macopharma, BC0110010) con una concentración final respectiva de 0,5 gramos/litro; 1 g/litro; 1g/L y 0,05g/L. Este baño permite reducir los riesgos de desarrollo microbiano durante el cultivo que serían secundarios a la contaminación durante el muestreo.

- 10 Una vez descontaminado el cordón, se lava con PBS tanto la vena como la parte externa del cordón. Se inyectan 10 ml de PBS dentro de la vena umbilical con una jeringa para eliminar la sangre residual. Luego, el cordón se corta previamente en trozos de 5 cm con un bisturí estéril y luego se hacen cortes transversales finos (de 2 a 3 mm de espesor). Estas piezas se colocan luego en platos de cultivo con tapa removible (TPP, 90552). La adhesión en seco de las piezas al fondo de las placas se realiza durante 15 minutos, luego se agrega medio completo, compuesto por α -MEM suplementado con 5% de lisado de plaquetas (Macopharma, BC0190020) en presencia de gentamicina y heparina. El cultivo se lleva a cabo en una incubadora dedicada a 37°C y 5% CO₂ e hipoxia (5% O₂). Después de 5 días, se cambia el medio de cultivo.

Después de aproximadamente 10 días de cultivo, las CSM-GW habrán migrado y adherido al fondo de las placas de cultivo. A continuación, se extraen las piezas con unas pinzas estériles y se lava la caja con tampón PBS. A continuación, las células se cultivan hasta la confluencia (>80 %) entre 15 días y 3 semanas (entre D14 y D21).

Cultivo de CSM-GW

- 20 Tras obtener la confluencia, las células se separan por la acción de la tripsina GMP recombinante (TrypLE, Invitrogen).

- 25 Después del lavado, las células se vuelven a sembrar a 1×10^3 células por cm² en el paso 1 en medio completo. Se utiliza una unidad de cultivo de 2 etapas con una superficie de 1270 cm² del tipo CellSTACK (CELLSTACK2, Macopharma) y una tapa universal con chimenea (Bouchon MPC, Macopharma). El kit de inoculación (BC0400011, Macopharma) incluye el sistema de tubos que permite el suministro de los distintos componentes del medio y de las células, así como los conectores para la conexión al contenedor de cultivo.

- 30 Se cambia el medio una vez por semana hasta obtener confluencia (>80%) (entre D7 y D8 de cultivo). Para ello se utiliza un kit de cambio de medio (BC0400021, Macopharma) que comprende el sistema de tubos que permite el suministro de los distintos componentes del medio, una bolsa de residuos, así como los conectores para la conexión al contenedor de cultivo, así como una tapa universal con chimenea. Sin embargo, la mayoría de las veces, el paso P1 dura 1 semana y no es necesario el cambio de medio.

Al llegar a la confluencia, las células se criopreservan en un banco celular primario (en inglés, Master Cell Bank ou MCB). La Food and Drug Administration (FDA) define un MCB como una colección de células de composición uniforme, derivadas de un solo tejido o célula, y almacenadas en alícuotas en condiciones definidas.

Recolección final de células.

- 35 Después de obtener la confluencia al final del paso P1, las células se recogen por la acción de la tripsina como se ha descrito anteriormente y luego se lavan. Se lleva a cabo una comprobación de viabilidad y recuento de células, así como las diversas comprobaciones P1 (véase tabla a continuación). A continuación, las células se congelan.

Almacenamiento de CSM del MCB

- 40 Las CSM se almacenan en tanques (en vapor de nitrógeno) a -150°C con registro continuo de la temperatura y el nivel de nitrógeno. Además, también se congelan de 5 a 10 tubos de muestra de CSM para realizar los controles.

Descongelación del MCB y lavado de CSM

Las CSM se descongelan y se lavan usando una técnica de tipo Sepax (Biosafe), luego se vuelven a sembrar en el paso 2 y luego en el 3 de acuerdo con el mismo protocolo que para P1.

Recolección final de células.

- 45 Después de obtener la confluencia al final del paso P3, las células se recolectan por acción de la tripsina como se describió anteriormente y luego se lavan. Se lleva a cabo un control de viabilidad y recuento de células, así como los distintos controles de fin de producción (véase tabla a continuación). Luego, las células se congelan en un banco de células en funcionamiento (en inglés, Working Cell Bank o WCB). La Food and Drug Administration (FDA) define un WCB como una recolección de células derivadas de una o más alícuotas de un MCB. Las células del MCB se expanden mediante subcultivos en serie hasta el paso seleccionado, después de lo cual las células se agrupan, concentran y dividen en alícuotas. Una o más partes alícuotas de WCB así obtenidas pueden usarse para producir un lote del producto final para su uso.

Almacenamiento de CSM del WCB

Las CSM se almacenan en tanques (en vapor de nitrógeno) a -150°C con registro continuo de la temperatura y el nivel de nitrógeno. Además, también se congelan de 5 a 10 tubos de muestra de CSM para realizar los controles.

Descongelación, lavado de las CSM del WCB y transporte de las CSM

- 5 Las CSM se descongelan y se lavan mediante una técnica tipo Sepax (Biosafe), luego se recogen en un volumen de 75 mL con albúmina al 4% y se almacenan entre 4 y 10°C . Las CSM se envasan en una bolsa (bolsa de 150 ml), etiquetadas según el procedimiento reglamentario; dicha bolsa se coloca en un embalaje secundario (bolsa de plástico) también etiquetado y luego en un contenedor de transporte con un registrador de temperatura, un certificado de validación, un aviso de inyección y una hoja de tolerancia después de la administración. Las CSM son transportadas
- 10 al sitio de administración por un transportista aprobado por la CHRU.

Controles de calidad realizados durante el proceso de producción

Para garantizar la esterilidad y seguridad del producto a administrar, se realizan controles del producto en cada etapa del proceso de cultivo. Todos los controles de calidad están listados en el Tabla 1.

Tabla 1

Etapas	Comprobaciones realizadas en cada etapa
Recibo de muestreo:	Marcadores infecciosos del donante (Serología / DGV)
Cambio de medio El medio se cambia una vez por semana.	control de esterilidad
Tripsinación: fin P0	Numeración
	Viabilidad celular
	fenotipo celular
	control de esterilidad
	CFU-F
Tripsinación: fin P1 MCB	Numeración
	Viabilidad celular
	fenotipo celular
	control de esterilidad
	Control de la ausencia de endotoxinas y micoplasmas
	CFU-F
	Control de la diferenciación en células de tejido mesodérmico
	Telomerasa (hTERT)
	Cariotipo
	Cultivo mixto de linfocitos
	Prueba de potencia (en definición)
Tripsinación: fin P2	Numeración
	Viabilidad celular
	fenotipo celular
	Control de esterilidad
	CFU-F
	Numeración
	Viabilidad celular

Etapas	Comprobaciones realizadas en cada etapa
Recolección final: fin P3 (precongelación) Después de obtener la confluencia al final de P ₃ , las CSM se tripsinizan, se lavan y luego se congelan.	fenotipo celular
	control de esterilidad
	Control de la ausencia de endotoxinas y micoplasmas
	CFU-F
	Control de la diferenciación en células de tejido mesodérmico
	Telomerasa (hTERT)
	cariotipo
	Cultivo mixto de linfocitos
	Prueba de potencia (en definición)

Controles celulares

Conteo de células

- 5 En el producto de partida y en cada paso de recolección de células (P0 y P3), el recuento de células se determina usando un hemocitómetro después de la lisis de los glóbulos rojos.

Viabilidad celular

En el producto inicial y en cada paso de recolección de células, la viabilidad se determina mediante citometría de flujo marcando con 7 AAD al final de P0, P1, P2, P3 debe ser > 80 %.

Fenotipo celular

- 10 La expresión de los marcadores de superficie característicos de un tipo celular se determinará mediante citometría de flujo tras marcar las células con anticuerpos monoclonales o los controles de isotipo correspondientes.

Al menos el 60% de las células deben expresar los siguientes antígenos: CD90, CD73, CD105, CD44 y el 80% de las células no expresan: CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR (y/o MFI < 2 veces MFI del control de isotipo). El marcador CD106 debe identificarse en al menos el 10% de las células.

15 CFU-F

- 20 La capacidad clonogénica se medirá mediante el cultivo de progenitores de fibroblastos (unidad formadora de colonias de fibroblastos: UFC-F). Las CFU-F (> 50 células) se contarán bajo un microscopio invertido con un aumento de $\times 10$, después de la fijación con metanol y la tinción con Giemsa. En resumen, 2,5 y 5 $\times 10^2$ células se siembran en 5 ml de medio en un matraz de 25 cm². El medio se renueva en su totalidad dos veces por semana. Se detiene el cultivo en D10, se fija y se tiñe con Giemsa. Luego se cuentan las colonias de más de 50 células. El cultivo de CFU-F se realiza al final de cada paso.

Control inmunológico

- 25 Se comprueba la ausencia de capacidad inmunoestimuladora de las CSM. Para ello se realizará un cultivo mixto de linfocitos utilizando las CMM producidas e irradiadas como células estimulantes y las células mononucleares de 2 controles sanos. El efecto inmunoestimulante se evalúa midiendo el índice de estimulación. Estas pruebas se llevan a cabo en el sector de control de calidad del departamento de medicamentos de terapia innovadora preparados ad hoc (MTI-PP) de la Unidad de Terapia Celular y Banco de Tejidos (UTCT) en Nancy. El efecto de inmunomodulación se evalúa agregando CSM a un cultivo de linfocitos mixto convencional como tercer asociado.

Control microbiológico

- 30 Controles de marcadores infecciosos de donantes

- 35 El diagnóstico genómico viral se realiza conjuntamente en el donante para VIH, VHB y VHC. Los marcadores infecciosos compatibles son: VIH : Prueba combinada Ag P24 + Ac anti VIH 1+2: Negativo, PCR de VIH: Negativo, VHB: Ag HBs negativo, Ac anti-HBc negativo, PCR del VHB: Negativo, VHC : Ac anti VHC: Negativo, PCR VHC: Negativo, HTLV : Ac anti HTLV I+II : Negativo, Sífilis : Ac anti-TP: Negativo, CMV, VEB y Toxoplasmosis: IgM negativo, IgG negativo o positivo.

Bacteriología

- 5 El control microbiológico se realiza según las recomendaciones de la Agencia Nacional para la Seguridad de Medicamentos y Productos Sanitarios (ANSM) para Productos de Terapia Celular (PTC) a partir de hemocultivos aeróbicos y anaeróbicos realizados mediante la técnica Bactec. Este control se realiza en cada etapa del cultivo. En las CSM descongeladas, los resultados de los controles obtenidos a posteriori de la inyección de CSM al paciente debe ser negativo. En caso de control microbiológico positivo tras la reinyección, se informará inmediatamente al clínico, se comunicará la identificación del germen así como los resultados del antibiograma de acuerdo con el procedimiento interno del servicio del MTI-PP.

Otros controles

- 10 La ausencia de la transcripción de hTERT

La ausencia de actividad de Telomerasa se busca mediante qRT-PCR en las CSM después del cultivo (final de P1 y P3). Este control se realizará sobre una alícuota criopreservada de 10^6 CSM.

Cariotipo

- 15 Se lleva a cabo sobre una muestra celular fresca de CSM obtenida al final del cultivo (final de P1 y P3), antes de la criopreservación.

Dosis de endotoxinas y micoplasmas

Se realiza sobre una muestra celular fresca o congelada de CSM obtenida al final del cultivo (final de P1 y P3), antes de la criopreservación.

Administración de CSM

- 20 Las células así preparadas se administran a pacientes hospitalizados en cuidados intensivos con choque séptico o sepsis a una dosis de al menos 1×10^6 /kg CSM heterólogas en 75 ml de albúmina al 4 %, NaCl, ACD, infundidos durante 30 minutos a través de una vía venosa central. El tratamiento se recibe y administra por vía venosa central preferiblemente dentro de las 10 horas posteriores a la etapa de descongelación y lavado de las CSM del WCB, y como máximo hasta 24 horas posteriores a la etapa de descongelación y lavado de las CSM del WCB.

- 25 Modelo de ratón de choque séptico

Se indujo choque séptico en ratones inmunocompetentes C57BL/6 mediante ligadura y perforación del intestino ciego (CLP). Este modelo, considerado como el mejor estándar de choque séptico murino, permite simular la peritonitis humana.

- 30 Después de la cirugía, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos: un grupo recibió $0,25 \times 10^6$ CSM de GW humana, un grupo recibió $0,25 \times 10^6$ CSM de OM obtenidas por cultivo de una muestra de médula ósea de un donante sano que dio su consentimiento y un grupo de control que recibió PBS. La administración de CSM así como de PBS se realizó a las 24 horas del inicio del choque séptico por vía intravenosa a nivel del seno retroorbitario.

El CSM-GW y el CSM-MO se utilizan justo después de la descongelación sin recultivo previo.

Ejemplo 2: Efecto de CSM-GW sobre el choque séptico en ratones

- 35 Impacto de las CSM-GW en la bacteriemia

Protocolo

Se utilizan CSM-GW humanas descongeladas.

- 40 Cuarenta y ocho horas después del comienzo del choque séptico, es decir, 24 horas después de la administración de CSM, los ratones se sacrificaron mediante inyección letal de anestésico. Se tomaron el bazo y la sangre de los ratones y luego se sembraron para contar el número de CFU (unidad formadora de colonias).

La comparación de los diferentes grupos se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados

- 45 Dos días después del choque séptico, solo los ratones tratados con CSM-GW mostraron una reducción significativa de la bacteriemia y del número de UFC esplénicas. Se contó el número medio de CFU por miligramo de bazo o sangre. Cuarenta y ocho horas después del procedimiento de CLP, el grupo tratado con CSM-GW presentó un promedio de 2.3×10^3 UFC aeróbicas por mg de bazo y $5.8 \cdot 10^3$ CFU anaeróbicas por mg de bazo, mientras que el grupo de control y el grupo tratado con CSM de MO exhibieron un número promedio de CFU aeróbicas por mg de bazo,

respectivamente, de 9.5×10^4 y 5.5×10^3 y un número medio de UFC anaeróbicas por mg de bazo respectivamente de 1.3×10^5 y 1.1×10^4 (Figuras 1A y 1B).

5 Los resultados obtenidos en sangre son similares (Figura 2A y 2B). El grupo tratado con CSM de la gelatina de Wharton presentó en promedio 6×10^3 UFC aeróbicas/ml de sangre y 2.1×10^4 CFU anaeróbico/ml de sangre, mientras que el grupo de control y el grupo tratado con CSM de MO exhibieron un número promedio de CFU aeróbico por ml de sangre, respectivamente, de 1.3×10^7 y 1.1×10^5 y un CFU anaeróbico promedio por ml de sangre, respectivamente, de 7.7×10^6 y 3.2×10^5 .

Conclusiones

10 Estos resultados muestran por primera vez una acción antibacteriana de las CSM derivadas de la gelatina de Wharton en choque séptico cuando se utilizaron inmediatamente después de la descongelación.

Impacto de las CSM-GW en la entrada de células dentro de los órganos

Protocolo

15 Cuarenta y ocho horas o 7 días después de la inducción del choque séptico, los ratones se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital y se extirparon los órganos. El bazo y el hígado se trituraron y luego se filtraron. Se extrajo médula ósea del fémur inyectando rápidamente 1 ml de PBS en la cavidad de la médula. Los pulmones se cortaron en trozos finos y luego se colocaron en 2 ml de colagenasa durante 45 minutos antes de triturarlos y filtrarlos. Las células extraídas de los diferentes órganos se lavaron por centrifugación. Se realizó un conteo de células.

20 Las células se marcaron con 5 μ L de anticuerpos anti-CD45, CD11b, Ly6C, Ly6G para identificar y cuantificar monocitos totales, monocitos inflamatorios y antiinflamatorios, así como neutrófilos dentro de los diferentes órganos.

El mismo protocolo se llevó a cabo en ratones sanos antes de la inducción del choque séptico.

La comparación de los diferentes grupos se realizó mediante una prueba ANOVA de 2 vías seguida de una prueba de Tukey. Se aceptó la significación estadística para $p < 0.05$.

Resultados

25 Dos días después de la inducción del choque séptico, los ratones de control que recibieron solución salina intravenosa mostraron recuentos de neutrófilos pulmonares significativamente más altos que los ratones tratados con inyección de células madre mesenquimales (Figura 3A). En D7, se observó una acumulación significativamente menor de neutrófilos en los bazos e hígados de ratones tratados con CSM de MO y GW ($p < 0.001$) (Figuras 3B, 3C). Siete días después de CLP, el número de neutrófilos contenidos en los fémures de los animales tratados fue significativamente menor en comparación con el grupo de control (PBS vs MO $p < 0.05$; PBS vs GW $p < 0.01$) (Figura 3D).

30 Dos días después de la inducción del choque séptico y 24 horas después de la inyección de CSM, los pulmones de los ratones que recibieron CSM de MO o GW contenían varios monocitos inflamatorios Ly6C^{alto} significativamente menor que en los ratones de control ($p < 0.01$) (Figura 4A). Una disminución significativa en el número de monocitos totales. (Figura 4B) y el número de monocitos inflamatorios Ly6C^{alto} (Figura 4C) en D2 también se encontró en los fémures de los ratones tratados con CSM-GW ($p < 0.05$) en comparación con los ratones de control, mientras que no se observaron diferencias significativas entre el grupo de control y el grupo CSM-MO.

35 Siete días después de la inducción del choque séptico, un recuento de monocitos inflamatorios Ly6C^{alto} se observó significativamente menos en los bazos de los ratones tratados con CSM-GW en comparación con los ratones tratados con CSM-MO ($p < 0.01$) y PBS ($p < 0.05$) (Figura 4D).

40 Este estudio demuestra que las CSM pueden modular el infiltrado de leucocitos en un modelo de sepsis polimicrobiana. Se muestra que la acción de las CSM-GW descongeladas no se limita a las primeras 48 horas después de su inyección, sino que son capaces de tener efectos mucho más tardíos sobre el reclutamiento de células durante el choque séptico.

45 Además de ser eficaces en una etapa tardía, las CSM también muestran una acción temprana sobre el tráfico de leucocitos. Se muestra en los resultados analizados anteriormente que las CSM disminuyen la entrada de neutrófilos en los pulmones 48 horas después de la inducción del choque séptico.

50 Estos resultados muestran que las CSM-GW, al igual que las CSM-MO, son capaces de reducir la acumulación de neutrófilos en los órganos, que están implicados en el desarrollo de la insuficiencia orgánica asociada al choque séptico. De hecho, se sabe que la acumulación anormal de neutrófilos puede inducir, por un lado, una oclusión vascular que conduce a hipoxemia e hipoperfusión tisular y, por otro lado, generar disfunciones de la microcirculación por liberación masiva de especies reactivas de oxígeno.

Además, a diferencia de las CSM de MO, las CSM-GW son capaces de reducir, por un lado, la producción femoral de monocitos totales dos días después del choque séptico y, por otro lado, la producción de monocitos proinflamatorios, lo que lleva a una menor acumulación de esta subpoblación de monocitos en el bazo de ratones. Dado que el choque séptico modifica las propiedades de los monocitos al inducir en particular un aumento en su producción de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a un aumento en la puntuación SOFA (evaluación de la insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis) (Martins et al., 2008), la disminución en la acumulación y producción de monocitos totales y proinflamatorios inducida por la inyección de CSM-GW puede traer un beneficio real en el tratamiento del choque séptico.

Impacto de CSM-GW en la supervivencia

Protocolo

Después de la inducción del choque séptico en ratones C57B1/6 mediante la técnica CLP, se administraron 150 µl de NaCl por vía subcutánea para permitir el llenado vascular después de la cirugía. Para estar lo más cerca posible de la clínica, todos los ratones recibieron una dosis de 50 µg/g de peso corporal de imipenem cada 12 horas por vía intraperitoneal (Alcayaga-Miranda et al., 2015).

Se realizó una prueba de Wilcoxon. Se admitió diferencia significativa para $p < 0,05$.

Resultados

La tasa de supervivencia aumenta en los ratones tratados con CSM en comparación con los ratones de control. Se encuentra una tasa de supervivencia del 64 % en los animales de control, mientras que el 83 % de los animales tratados con CSM-MO y el 87 % de los animales tratados con CSM-GW sobrevivieron (Figura 5).

Las CSM-GW muestran un mejor resultado en términos de supervivencia en choque séptico en comparación con las CSM-MO.

Ejemplo 3: Estudio del impacto de CSM-GW en sepsis

La eficacia de las CSM-GW descongeladas de grado clínico producidas según el método descrito en las partes 1.1-1.6 anteriores se analiza en cerdos, que son los animales más parecidos a los humanos desde el punto de vista cardiovascular.

Cuatro horas después de la inducción de peritonitis en cerdos, una dosis de CSM-GW de 1×10^6 /kg fue inyectado por vía intravenosa. Las CSM-GW se produjeron en grado clínico y se utilizaron inmediatamente después de la descongelación. El estudio, realizado durante las 24 horas siguientes a la inducción de la peritonitis, se realizó a doble ciego y en presencia de un médico intensivista experimentado. En consecuencia, el manejo fue idéntico al de un paciente con mantenimiento por un lado de la volemia y presión arterial media (>85 mmHg) por llenado vascular y por noradrenalina (máximo $10 \mu\text{g/kg/min}$) y por otro lado un adecuado gasto cardiaco (>21 min/m²) por dobutamina (máximo $20 \mu\text{g/kg/min}$).

Este estudio muestra que la administración de CSM-GW mejora significativamente la saturación venosa de oxígeno, lo que indica una mejor coincidencia entre O_2 y consumo de O_2 en animales tratados (Figura 6A).

La administración de CSM-GW mejora las funciones cardiovasculares como lo demuestra la mejora de la presión arterial media (PAM) en los animales tratados y la posterior administración de norepinefrina (Figuras 6B, 6C). La administración de CSM-GW mejora la función renal: los animales tratados mostraron un menor aumento de la creatinina y una mayor diuresis (Figuras 6D, 6E).

Además, la inyección intravenosa de CSM-GW reduce significativamente los niveles de lactato, cuya producción supera los 2 mmol/l evidencia hipoxia tisular. (Figura 6F).

La inyección intravenosa de CSM-GW también aumenta la proporción de $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, que refleja la intensidad del síndrome de dificultad respiratoria aguda (Figura 6G). Su aumento en los animales tratados demuestra una menor insuficiencia pulmonar en comparación con los animales no tratados.

Se observa en este experimento que el aumento de la supervivencia de los animales tratados respecto a los animales no tratados es de aproximadamente un 60%. (Figura 6H).

Ejemplo 4: Análisis sobre factores obstétricos

Se analizaron 50 cordones umbilicales combinando diferentes parámetros obstétricos. Las CSM-GW se aíslan de estos tejidos de acuerdo con el método descrito en la parte 1.1-6 anterior.

Después de la extracción de datos, los 27 factores obstétricos (14 relacionados con la madre, 6 con el recién nacido y 7 con el parto) se analizan en busca de correlaciones entre estos parámetros obstétricos y 8 indicadores biológicos de proliferación celular (duplicación de la población). Cada variable se sometió a análisis de regresión lineal bivariada

(RLB). Solo los factores que mostraron una asociación significativa en el umbral de 0,15 en RLB fueron candidatos para el análisis de regresión lineal multivariable (RLM). Se utilizó el método de selección de variables Stepwise con un umbral de entrada del modelo de 0,1 y un umbral de salida del modelo de 0,05.

Después del análisis de regresión lineal multivariable, la administración de oxitocina en el momento del parto mostró un impacto positivo en la proliferación de CSM-GW al disminuir el tiempo de duplicación ($61,6 \pm 5,2$ h vs $112,0 \pm 19,5$ h, $p = 0,0159$) durante el primer paso P1 (Figura 7A). Esta administración de oxitocina también resultó en un mayor número de células con un tiempo de duplicación corto (<100 horas) ($57,9\%$ vs 25% , $p = 0,0469$). Considerando solo las muestras con un tiempo de duplicación P1 inferior a 100 horas, varios factores incidieron positivamente en el tiempo de duplicación: el trabajo supervisado ($34,2\%$ vs 0% , $p = 0,0185$), el número de semanas de amenorrea al nacer ($39,85$ vs $37,92$, $p = 0,0212$), tabaquismo materno ($42,1\%$ vs $8,3\%$, $p = 0,0313$) y peso placentario ($552,24$ vs $481,92$, $p = 0,0446$). En el segundo paso (P2), el peso al nacer, el número de semanas de amenorrea, el peso de la placenta, el embarazo normal y la ausencia de preeclampsia mostraron un impacto positivo en la proliferación celular (Figura 7B). Todos estos factores están relacionados con la noción de nacimiento a término y permiten demostrar que las CSM-GW de recién nacidos sanos nacidos a término tendrán capacidades proliferativas superiores. También se observa que las CSM-GW derivadas de cordones umbilicales de madres fumadoras tienen capacidades proliferativas aumentadas.

La identificación de estos factores que favorecen la proliferación de CSM-GWs permite ayudar en la selección de cordones umbilicales que contengan CSM-GWs con mejores propiedades de proliferación.

BIBLIOGRAFÍA

Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Martin, A., Contreras, L., Figueroa, F.E., and Khoury, M. (2015). Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Res. Ther.* 6.

Chao, Y.-H., Wu, H.-P., Wu, K.-H., Tsai, Y.-G., Peng, C.-T., Lin, K.-C., Chao, W.-R., Lee, M.-S., and Fu, Y.-C. (2014a). An Increase in CD3+CD4+CD25+ Regulatory T Cells after Administration of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells during Sepsis. *PLoS ONE* 9, e110338.

Chinnadurai, R., Copland, I. B., Garcia, M. A., Petersen, C. T., Lewis, C. N., Waller, E. K., Kirk, A. D., and Galipeau, J. (2016). Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells Are Susceptible to T-Cell Mediated Apoptosis Which Is Partly Rescued by IFN γ Licensing. *Stem Cells*, 34(9), 2429-2442.

Condor, J.M., Rodrigues, C.E., Sousa Moreira, R. d., Canale, D., Volpini, R.A., Shimizu, M.H.M., Camara, N.O.S., Noronha, I. d. L., and Andrade, L. (2016). Treatment With Human Whartons Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuates Sepsis-Induced Kidney Injury, Liver Injury, and Endothelial Dysfunction. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 1048-1057.

Devaney, J., Horie, S., Masterson, C., Elliman, S., Barry, F., O'Brien, T., Curley, G.F., O'Toole, D., and Laffey, J.G. (2015). Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by *E. coli* in the rat. *Thorax* 70, 625-635.

Dombrovskiy, V.Y., Martin, A.A., Sunderram, J., and Paz, H.L. (2007). Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003*. *Crit. Care Med.* 35, 1244-1250.

François M, Copland IB, Yuan S, Romieu-Mourez R, Waller EK, Galipeau J (2012). Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*. 14(2):147-52.

Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., González, M.A., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58, 929-939.

Iskander, K.N., Osuchowski, M.F., Steams-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Stepien, D., Valentine, C., and Remick, D.G. (2013). Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. *Physiol. Rev.* 93, 1247-1288.

Kim, H., Darwish, I., Monroy, M.-F., Prockop, D.J., Liles, W.C., and Kain, K.C. (2014). Mesenchymal stromal (stem) cells suppress pro-inflammatory cytokine production but fail to improve survival in experimental staphylococcal toxic shock syndrome. *BMC Immunol.* 15, 1.

Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J.-W., and Matthay, M.A. (2010). Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *STEM CELLS* 28, 2229-2238.

- Luo, C., Zhang, F., Zhang, L., Geng, Y., Li, Q., Hong, Q., Fu, B., Zhu, F., Cui, S., Feng, Z., et al. (2014). Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Sepsis-associated Acute Kidney Injury in Mice: Shock 41, 123-129.
- Mei, S.H., McCarter, S.D., Deng, Y., Parker, C.H., Liles, W.C., and Stewart, D.J. (2007). Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. PLoS Med. 4, e269.
- 5 Mezey, E., Nemeth K. (2015). Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. Immunol. Lett. 168(2), 208-214.
- Moll, G., Geißler, S., Catar, R., Ignatowicz, L., Hoogduijn, M. J., Strunk, D., Bieback, K., and Ringdén, O. (2016). Cryopreserved or Fresh Mesenchymal Stromal Cells: Only a Matter of Taste or Key to Unleash the Full Clinical Potential of MSC Therapy? In F. Karimi-Busheri & M. Weinfeld (Eds.), Biobanking and cryopreservation of stem cells. (Vol. 951, Advances in Experimental Medicine and Biology., pp. 77-98). Cham, Switzerland: Springer.
- 10 Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S.T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., et al. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. Nat. Med. 15, 42-49.
- Pedrazza, L., Lunardelli, A., Luft, C., Cruz, C.U., de Mesquita, F.C., Bitencourt, S., Nunes, F.B., and de Oliveira, J.R. (2014). Mesenchymal stem cells decrease splenocytes apoptosis in a sepsis experimental model. Inflamm. Res. 63, 719-728.
- 15 Rojas, M., Cárdenes, N., Kocyildirim, E., Tedrow, J.R., Cáceres, E., Deans, R., Ting, A., and Bermúdez, C. (2014). Human adult bone marrow-derived stem cells decrease severity of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in sheep. Stem Cell Res. Ther. 5, 42.
- 20 Wu, K.-H., Wu, H.-P., Chao, W.-R., Lo, W.-Y., Tseng, P.-C., Lee, C.-J., Peng, C.-T., Lee, M.-S., and Chao, Y.-H. (2015). Time-Series Expression of Toll-Like Receptor 4 Signaling in Septic Mice Treated with Mesenchymal Stem Cells: SHOCK 1.
- Zhao, X., Liu, D., Gong, W., Zhao, G., Liu, L., Yang, L., and Hou, Y. (2014). The Toll-like Receptor 3 Ligand, Poly(I:C), Improves Immunosuppressive Function and Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells on Sepsis via Inhibiting MiR-143: Poly(I:C) Improves MSCs Immune Function. STEM CELLS 32, 521-533.
- 25 Mervyn Singer, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, Gordon R. Bernard, Jean-Daniel Chiche, Craig M. Coopersmith, Richard S. Hotchkiss, Mitchell M. Levy, John C. Marshall, Greg S. Martin, Steven M. Opal, Gordon D. Rubenfeld, Tom van der Poll, Jean-Louis Vincent, and Derek C. Angus. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-810.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Células madre mesenquimales (CSM) humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso en el tratamiento de la sepsis, en particular el choque séptico; dichas CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton se caracterizan porque:
- 5 su nivel de expresión de CD44 es al menos un 20 % más bajo que el nivel de expresión de CD44 en las CSM humanas frescas obtenidas de la gelatina de Wharton; o
 su nivel de CD90, CD73, CD105, CD146 o CD166 es al menos un 10 % más bajo que el nivel de CD90, CD73, CD105, CD146 o CD166, respectivamente, en CSM humanas frescas derivadas de la gelatina de Wharton.
- 10 2. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según la reivindicación 1, caracterizadas porque el nivel de expresión de al menos un marcador seleccionado entre CD90, CD73, CD105, CD29, CD146, CD166, HLA-ABC es al menos un 10 % más bajo que el nivel de expresión del mismo marcador en CSM humanas frescas derivadas de la gelatina de Wharton.
- 15 3. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizadas porque dichas CSM expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende ACTB, ANXA1, CAPZB, LASP1, PRDX2, PRDX3, PSA3, RS12 y SYWC.
4. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque dichas CSM sustancialmente no expresan al menos una proteína seleccionada del grupo que comprende ACTS, ALIBI, ANX10, GBB1, GBB2, GPRIN1, DTNA, MIPO1, PSB3 y PSDE.
- 20 5. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas porque dichas CSM, en condición in vitro y/o en un estado no inflamatorio, secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7, IGFBP-1, insulina, FGF-7, NT-4 y VEGF-D.
6. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dichas CSM, en condición in vivo y/o en una condición inflamatoria, secretan al menos un factor de crecimiento seleccionado de BMP-7 y TGFβ3.
- 25 7. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizadas porque dichas CSM, en condición in vivo y/o en condición inflamatoria, no secretan sustancialmente IGFBP-1.
8. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizadas porque dichas células se derivan de tejido de cordón umbilical humano de una madre que cumple al menos uno de los siguientes criterios: haber recibido una administración de oxitocina durante el parto, haber dado a luz por trabajo de parto dirigido, haber dado a luz a término, que no presentó preeclampsia durante el embarazo, cuyo hijo no presentó trastornos neonatales y que tuvo una impregnación tabáquica durante el embarazo.
- 30 9. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizadas porque dichas CSM son células de grado clínico.
- 35 10. Las CSM humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizadas porque dichas células son directamente derivadas de la descongelación sin recultivarse tras la descongelación.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales humanas descongeladas derivadas de la gelatina de Wharton según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de la sepsis.

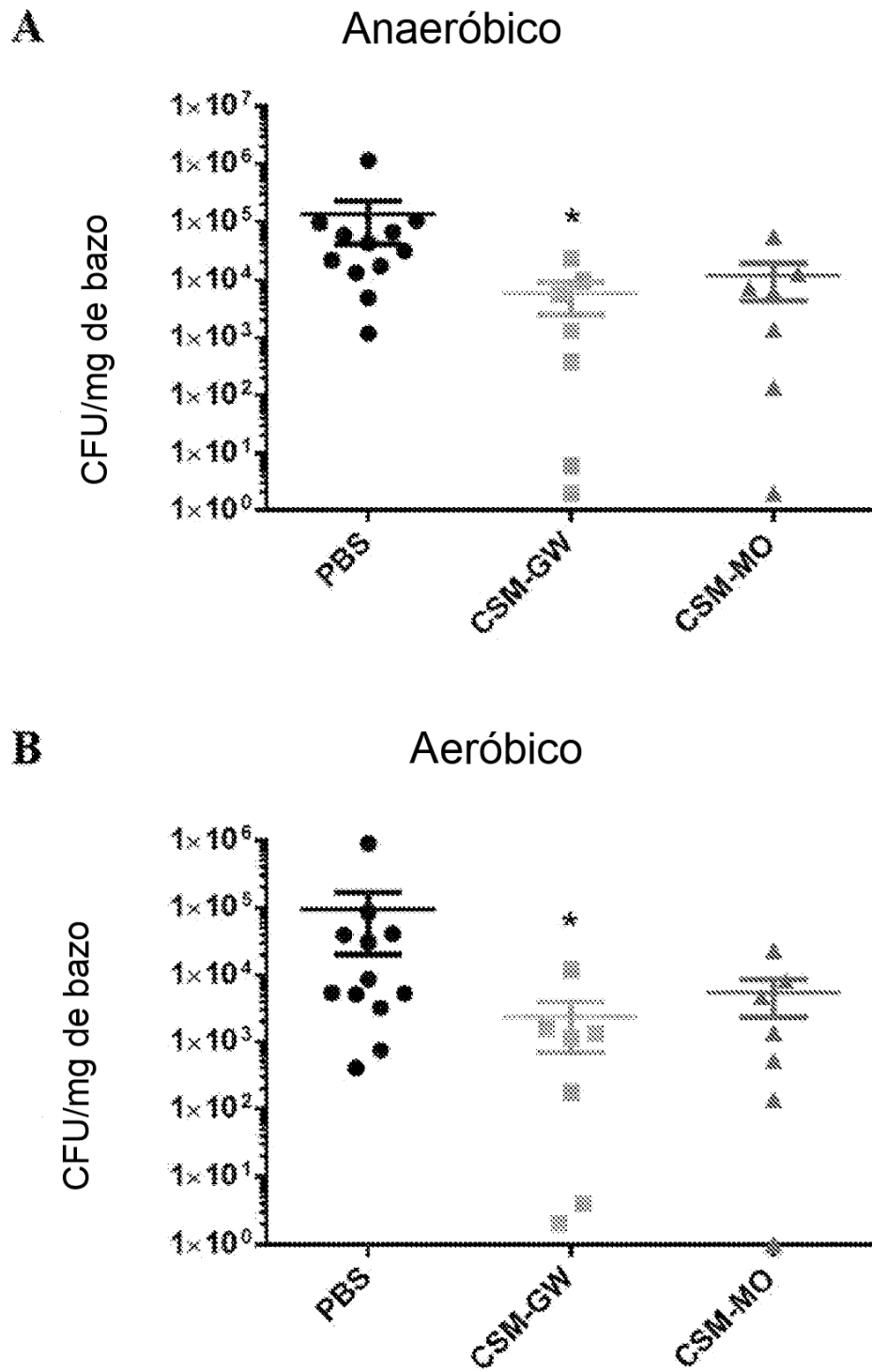


FIG. 1

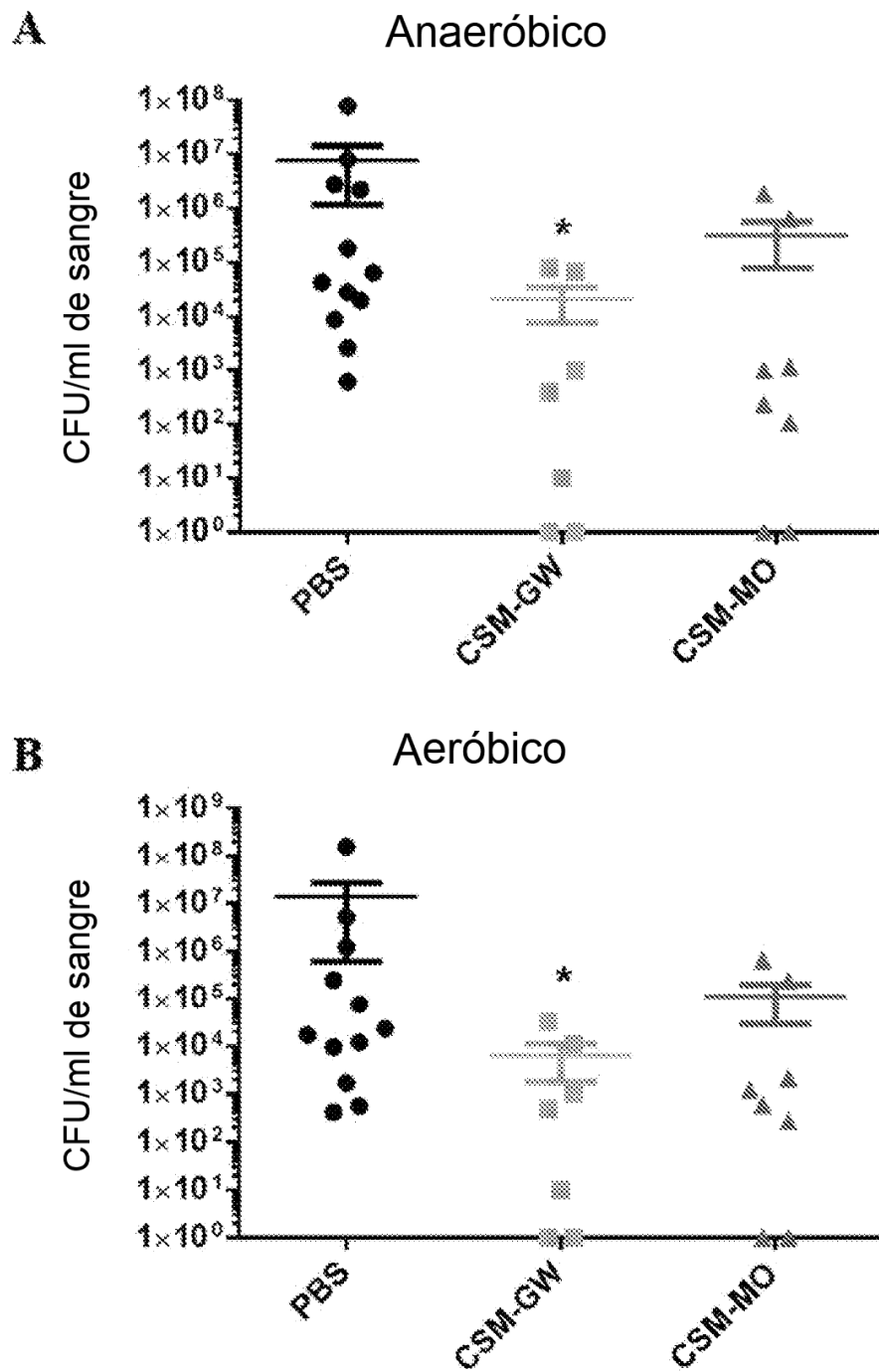


FIG. 2

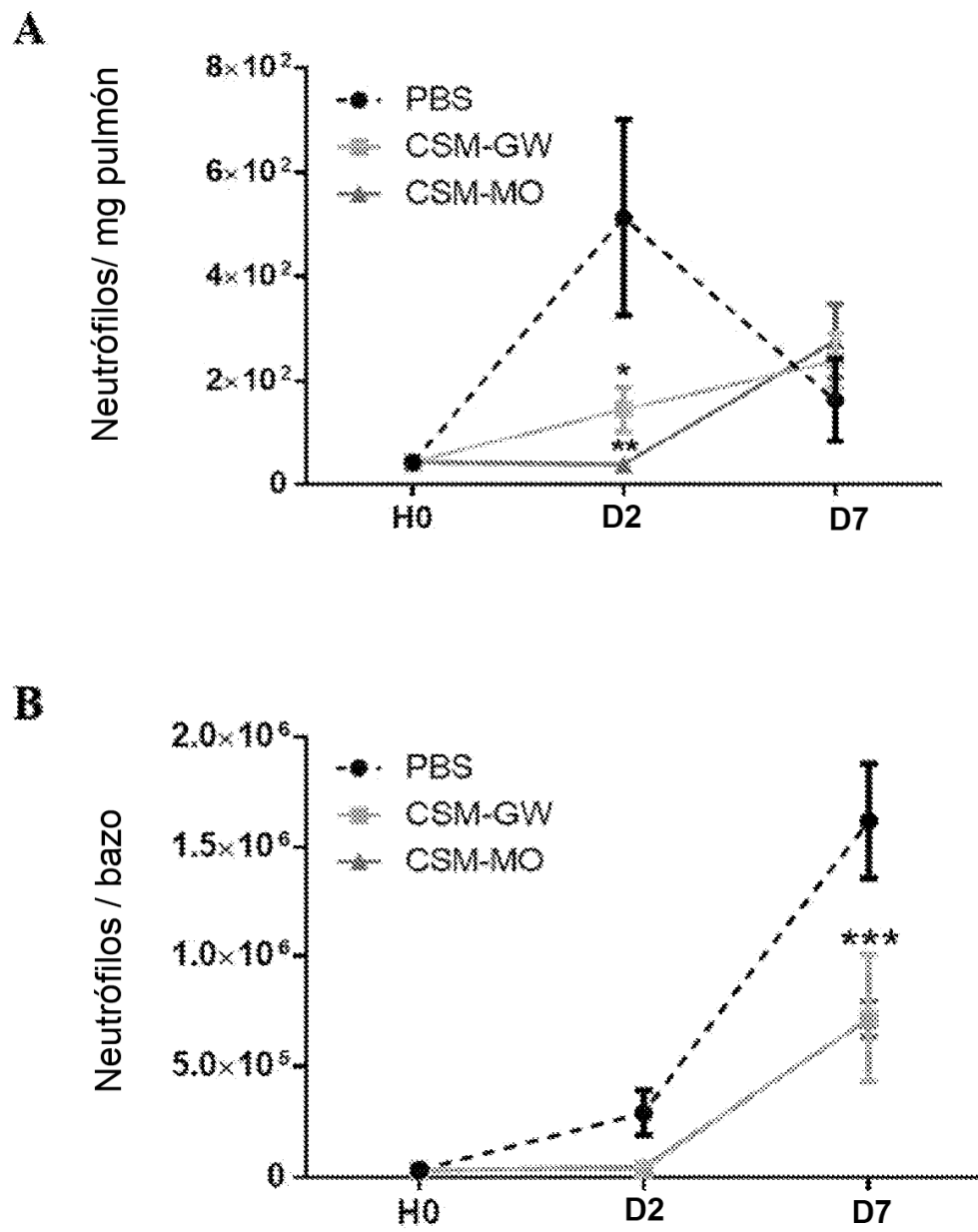


FIG. 3 A-B

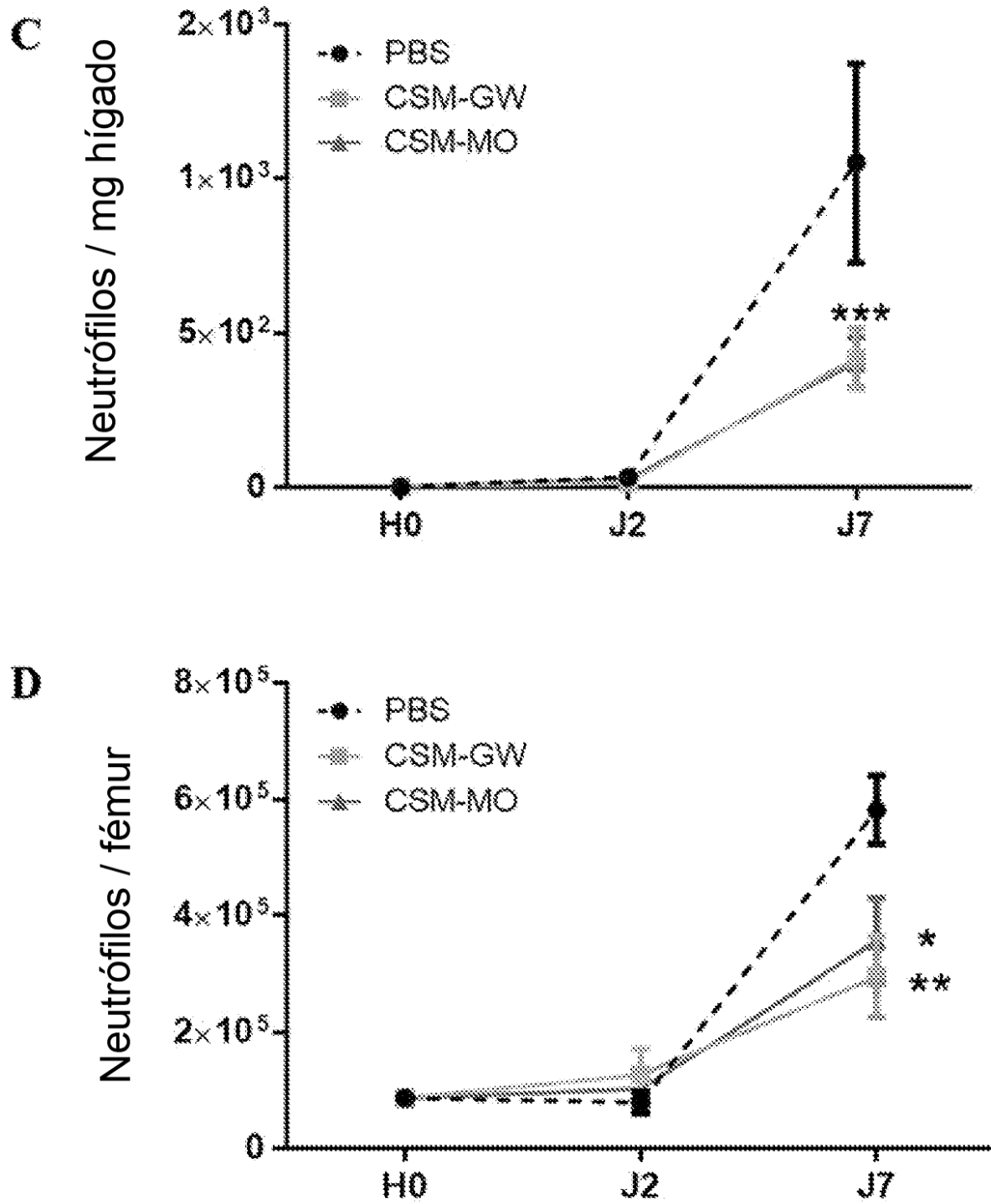


FIG. 3 C-D

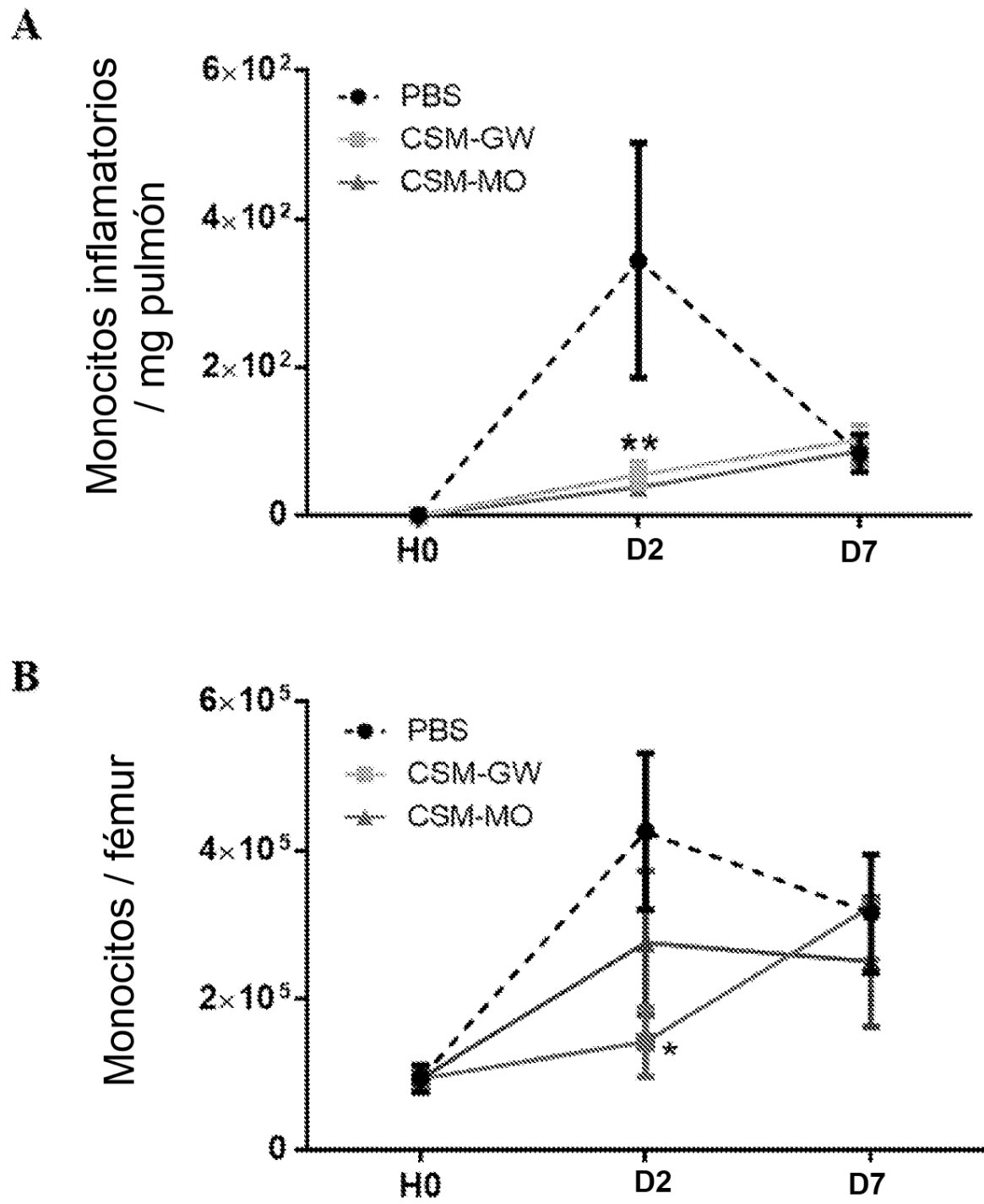


FIG. 4 A-B

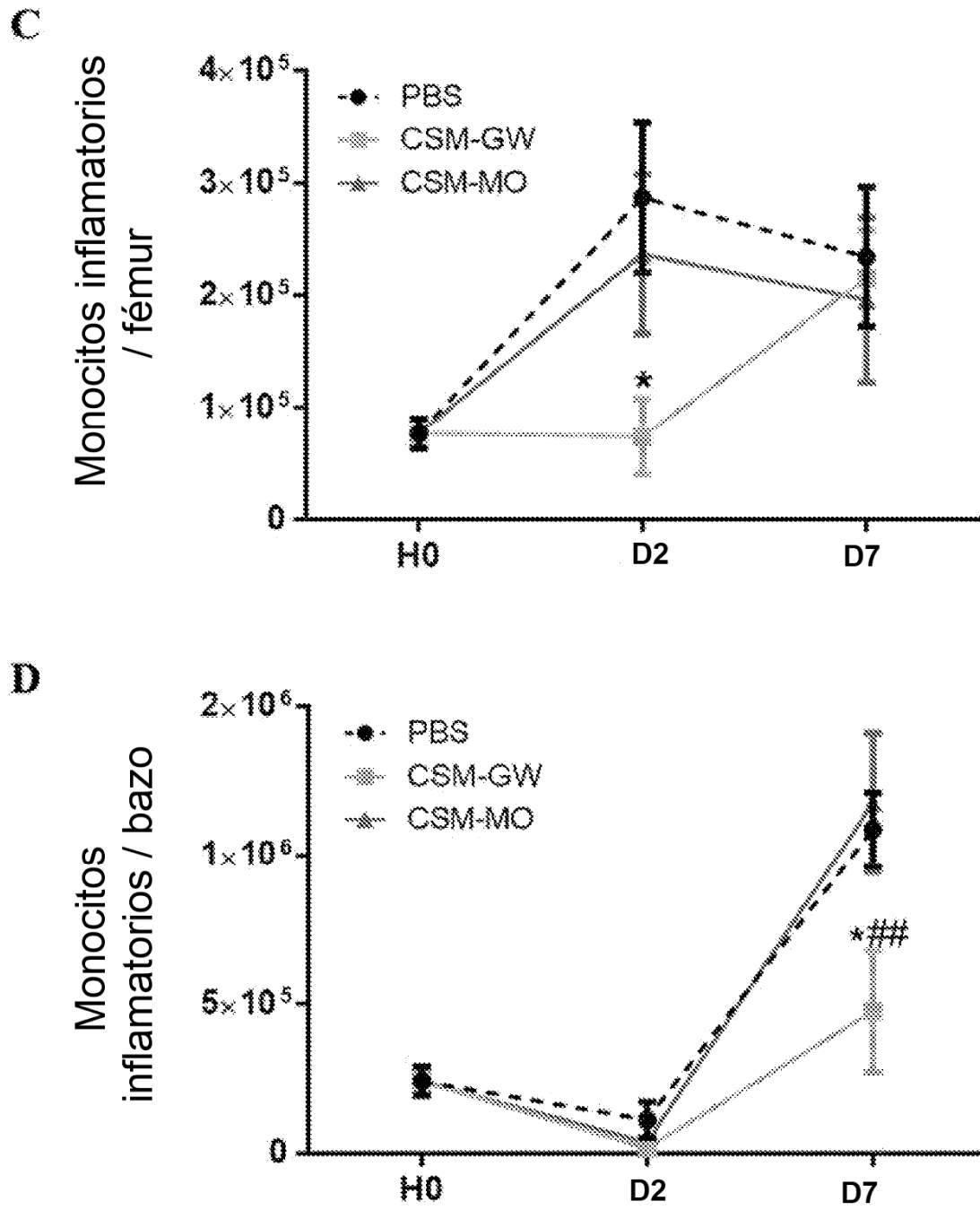


FIG. 4 C-D

7/12

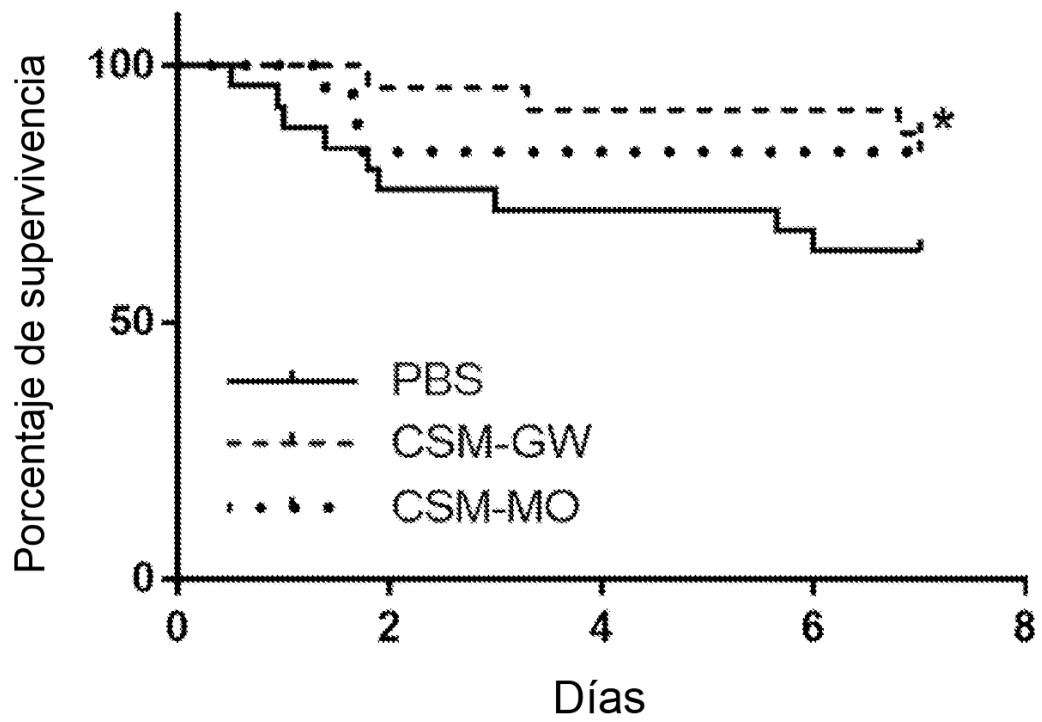


FIG. 5

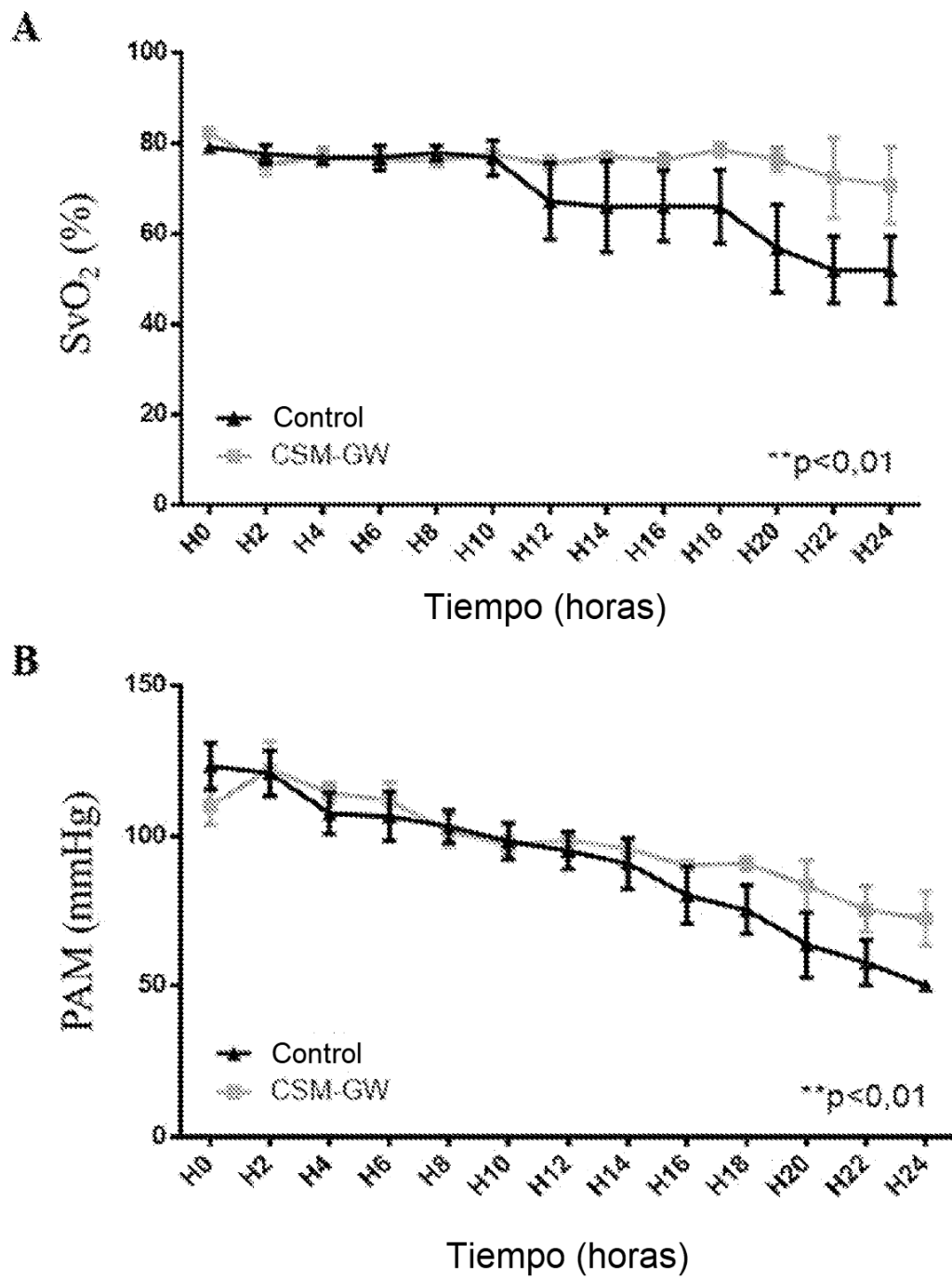


FIG. 6 A-B

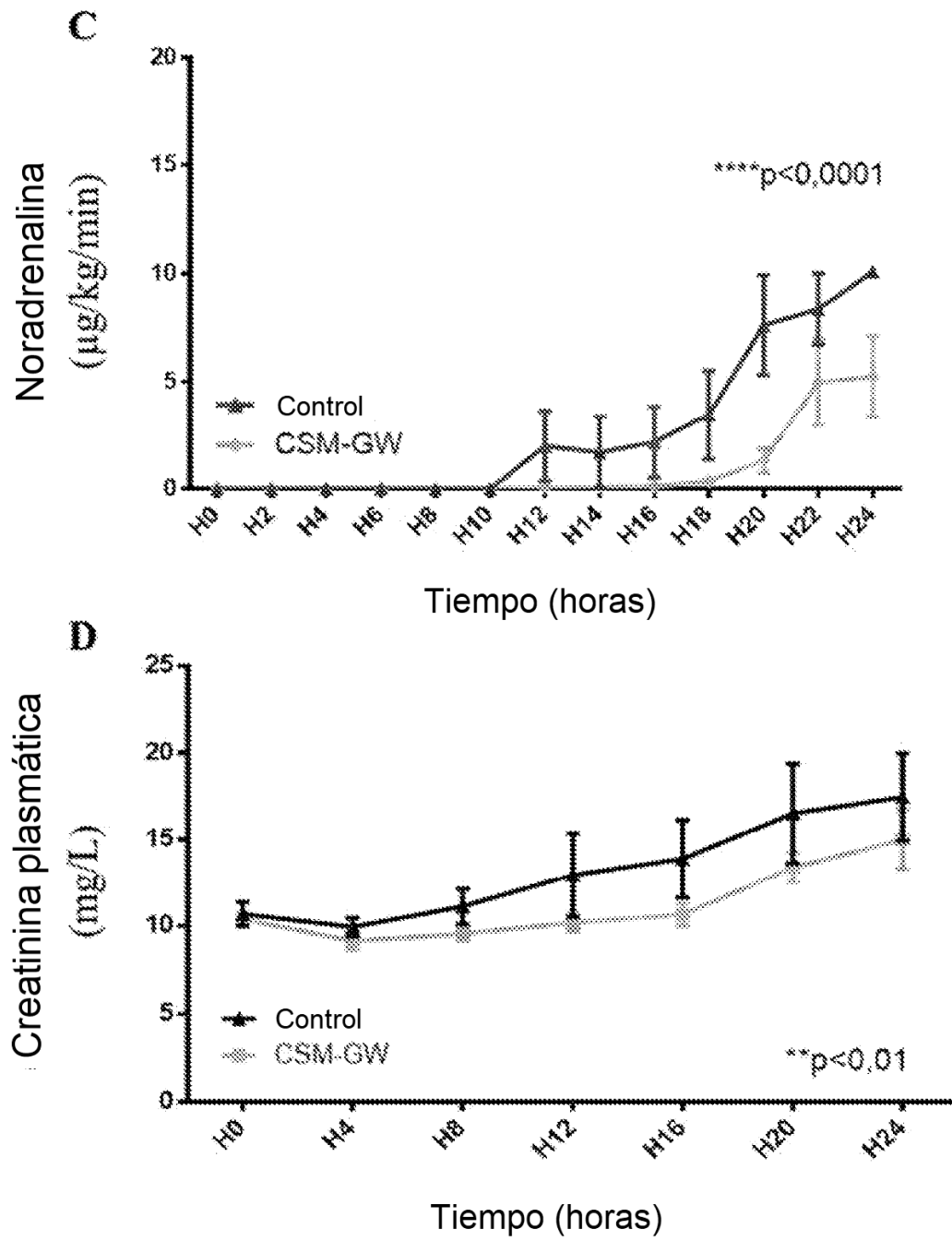


FIG. 6 C-D

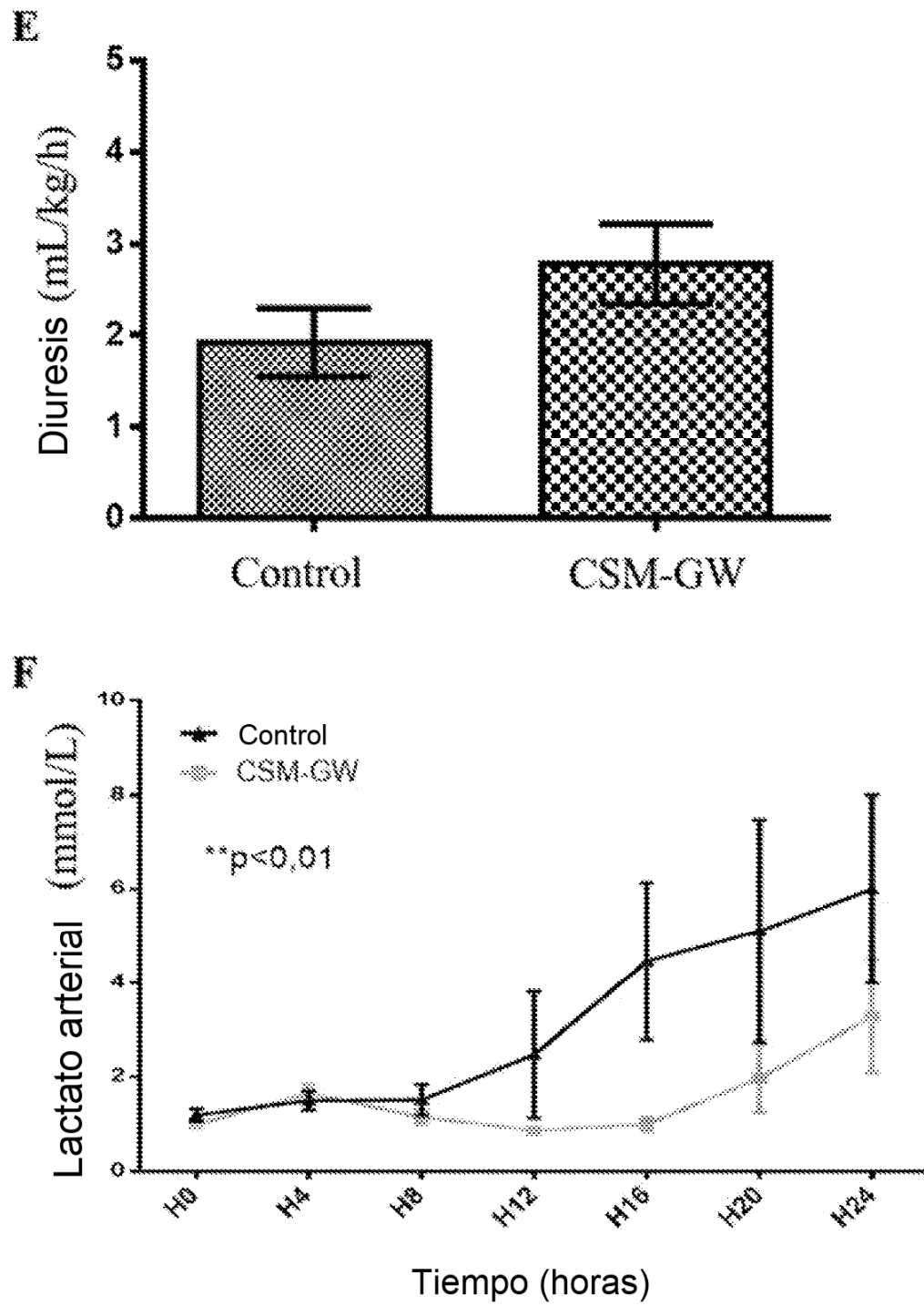
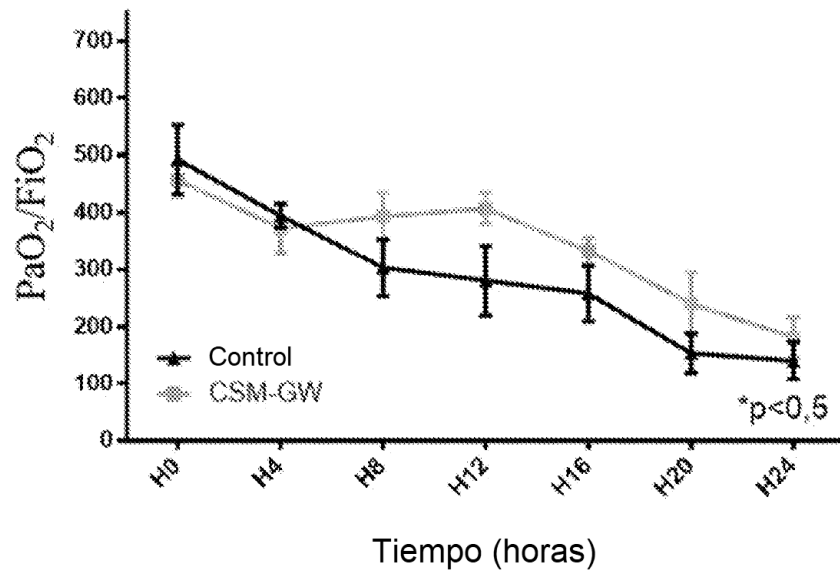


FIG. 6 E-F

G



H

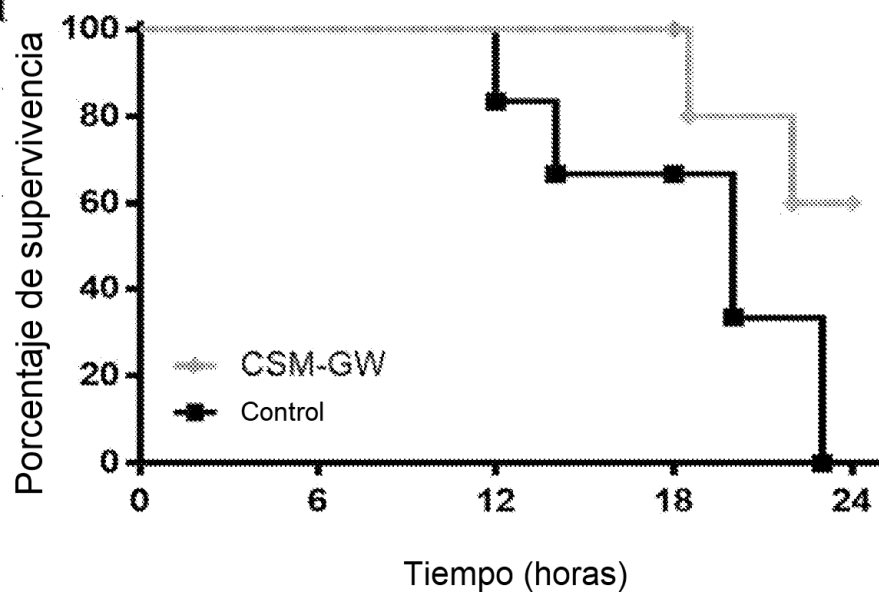


FIG. 6 G-H

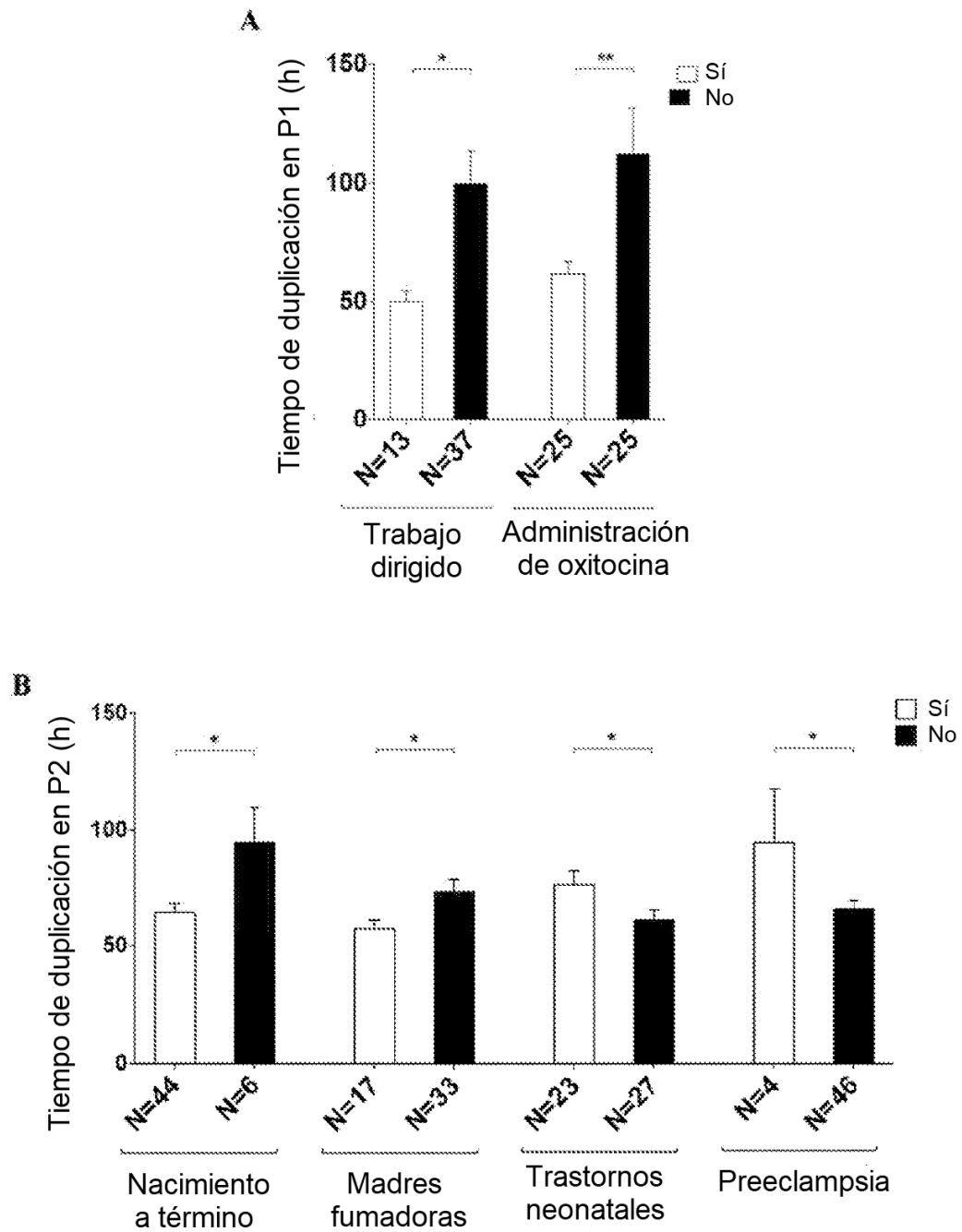


FIG. 7