

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 368**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
C08J 3/075	(2006.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 47/42	(2007.01)
C12N 5/0775	(2010.01)
A61K 38/01	(2006.01)
A61K 38/36	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/KR2014/010457**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16047849**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14902879 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3199169**

54 Título: **Composición que contiene un hidrogel con células madre mesenquimales y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

22.09.2014 KR 20140125981

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2025

73 Titular/es:

**ANTEROGEN CO., LTD. (100.00%)
405 NamsungPlaza (Gasán-dong) 130 Digital-ro
Geumcheon-gu, Seoul 153-782, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SUNG-KOO y
KIM, MIHYUNG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 3 009 368 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

Composición que contiene un hidrogel con células madre mesenquimales y método de producción de la misma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición que incluye células madre mesenquimales cultivadas en hidrogel, más específicamente, una composición de hidrogel que contiene células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, y a un método de preparación de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere a una
10 composición que incluye células madre mesenquimales cultivadas en hidrogel, lavadas y utilizadas para llenar una jeringa, en donde la composición de la presente invención puede administrarse fácilmente sin modificación y podría no requerir ningún tratamiento enzimático en el procedimiento final de preparación de células para el trasplante, prácticamente no se pierde ninguna célula debido a que la composición se lava en forma de hidrogel sin ningún
15 procedimiento de lavado que utilice centrifugación u otros métodos, y el efecto terapéutico se manifiesta inmediatamente después de la administración en un individuo debido a que se incorporan sustancias bioactivas en poros del hidrogel.

Antecedentes de la técnica

20 Los terapéuticos de células madre de primera generación convencionales son células aisladas que se obtienen mediante el tratamiento con proteasas, tales como tripsina o dispasa, en el que no se mantienen las uniones intercelulares y las proteínas de la membrana basal de las células debido a que todas las proteínas expuestas sobre las membranas celulares son degradadas no selectivamente por el tratamiento con proteasas. Además, se eliminan las
25 sustancias de origen animal, tales como el suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés), añadidas para inactivar las proteasas, mediante varios procedimientos de lavado-centrifugado, en los que se pierden 5 % a 10 % de las células en cada uno de los procedimientos de lavado-centrifugado. Por lo tanto, el procedimiento de recolección celular utilizando una proteasa resulta muy ineficiente.

Además, la proporción de células sedimentadas es bajo en el trasplante de las células individuales aisladas a una
30 zona enferma debido a que las células trasplantadas se descargan de una zona diana mediante difusión y absorción. Además, debido a que las células madre mesenquimales son altamente adhesivas, la tasa de supervivencia de las células madre mesenquimales individuales aisladas es muy bajo, ya que mueren entre 6 y 24 horas después de aislarlas.

35 El documento de patente n.º WO 2006/004951 proporciona un método de síntesis *in vivo de novo* de tejidos blandos que presentan una forma y tamaño predeterminados a partir de células madre mesenquimales adultas en andamiajes biocompatibles y una composición preparada mediante el mismo método. Dicho documento proporciona un método de utilización de polímero de hidrogel, más específicamente, diacrilato de polietilenglicol, como andamiaje biocompatible. Sin embargo, debido a que la composición está destinada a la recuperación de la unión de tejidos
40 blandos, la solicitud de patente anteriormente mencionada solo supone que prácticamente no debería producirse ningún cambio en el diámetro del andamiaje preparado mediante la utilización de diacrilato de polietilenglicol, y ni proporciona ni intuye un método de preparación que incluya el llenado de una jeringa con una sustancia cultivada para la administración inmediata.

45 La patente coreana n.º 1.289.834 proporciona un agente terapéutico regenerativo de esfínter que incluye células madre derivadas de líquido amniótico y describe que el agente terapéutico celular puede inyectarse en un compuesto de hidrogel, específicamente en alginato/PF-127/ácido hialurónico, para potenciar el efecto. Sin embargo, la patente anteriormente mencionada no proporciona que el procedimiento de recolección de células madre pueda mejorarse para incrementar el rendimiento.

50 La patente coreana n.º 684.940 proporciona un método de diferenciación de las células madre mesenquimales en condrocitos, más específicamente, un método de fijación de células madre mesenquimales en un andamiaje compuesto que incluye fibrina/Ha para el cultivo, en el que la fibrina/Ha es un polímero biodegradable. Sin embargo, la patente anteriormente mencionada solo proporciona que la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos puede potenciarse en el caso de que se utilice fibrina/Ha como andamiaje, incluso sin añadir TGF-beta, que se añade en el método convencional de diferenciación de células.

55 En los métodos convencionales, las uniones intercelulares y proteínas de la membrana basal pueden resultar dañadas por el tratamiento enzimático realizado en el procedimiento final de preparación de las células trasplantadas; pueden perderse células en cada uno de recolección celular, lavado, llenado de viales y llenado de jeringa con los materiales contenidos en un vial, y la mayoría de las sustancias bioactivas sintetizadas durante el cultivo celular, tales como el colágeno, son eliminadas ya que solo se recolectan células individuales y se inyectan después de un tratamiento enzimático.

60 La presente invención proporciona una composición que incluye células madre mesenquimales cultivadas en hidrogel, lavadas y llenadas en una jeringa, en donde la composición de la presente invención puede administrarse fácilmente

sin modificación y podría no necesitar un tratamiento enzimático en un procedimiento final de preparación de células para el trasplante, prácticamente no se pierde ninguna célula debido a que la composición se lava en forma de hidrogel sin ningún procedimiento de lavado que utilice centrifugación u otros métodos, y el efecto terapéutico se manifiesta inmediatamente después de la administración en el individuo debido a que se incorporan sustancias bioactivas en poros del hidrogel.

Lista de referencias

Literatura de patentes

WO2006/004951
 Patente coreana n.º 1.289.834
 Patente coreana n.º 684.940.
 US2014/227233 A1.

Literatura no de patentes

Wu X., Ren J., Li J., *Cytotherapy*, 2012, mayo; 14(5):555-62.
 Liao H.T. et al., *J. Trauma.*, 2011, enero; 70(1):228-37.
 Wang K. et al., *Tissue Eng parte A*, 2012, dic. ; 18(23-24) : 2507-17.
 Fang H. et al., *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.*, 2004; 24(3):272-4.
 Inok Kim et al., *Tissue Eng. parte A*, 2013 ; 19(21-22) : 2373-81.
 Catelas I. et al., *Tissue Engineering* 2006; 12(8): 2385-2396.

Descripción resumida de la invención

Problema técnico

El propósito de la presente invención es preparar células madre mesenquimales separadas de los tejidos adiposos y utilizarlos para el tratamiento de enfermedades. La presente invención proporciona un método mejorado de preparación de una composición celular para 1) evitar la pérdida de células en un procedimiento de recolección de células cultivadas de una cantidad suficiente, 2) evitar el daño en las células mediante el tratamiento de proteasas, y 3) minimizar la pérdida de células en la zona diana, y una composición preparada mediante el método. La composición celular preparada mediante el método mejorado se proporciona después de llenar una jeringa con la composición para facilitar el uso. El hidrogel con células preparado y llenado mediante el método proporcionado por la presente invención puede aplicarse en todos los agentes terapéuticos que pueden administrarse por vía local mediante la utilización de una aguja de calibre 20 a 25. La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Solución al problema

La presente exposición proporciona un método de cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un hidrogel y recolección de células madre-hidrogel mediante la utilización de una jeringa.

En la composición para el tratamiento de enfermedades de la presente exposición, las células madre mesenquimales son positivas para CD29, CD44, CD73, CD90, etc., o pueden ser células autólogas o alogénicas positivas para CD34 y CD45.

En un ejemplo de la presente invención, el hidrogel es cola de fibrina, en donde la concentración de fibrinógeno que constituye la cola de fibrina es de entre 0,9 y 1,6 mg/ml.

En un ejemplo de la presente invención, se mezclaron entre 100.000 y 2.000.000 células madre con 1 ml de hidrogel, 1 a 2 ml de la mezcla resultante se añadió a una placa de 12 a 24 pocillos para producir un gel, y se añadió un medio al gel para el cultivo durante tres a seis días. El medio puede ser un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) que incluye FBS al 10 % y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, por sus siglas en inglés) o factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) proporcionado por una patente convencional (Autologous and Allogenic Adipose Tissue-Derived Stromal Stem Cells Composition for Treatment of Fistula; número de registro de patente: 1.328.604) o DMEM que incluye entre 1 % y 10 % de albúmina sérica humana y entre 1 % y 50 % de una composición preparada mediante un método proporcionado por una patente convencional (Method for Preparation of Mesenchymal Stem Cell Culture Comprising High Concentration of Cell Growth Factors and Composition Prepared Therefrom; número de solicitud de patente: 10-2011-0043953).

Efectos ventajosos de la invención

El método de preparación de una composición que incluye un hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de la presente patente resulta muy útil, debido a que no se requiere ningún tratamiento enzimático en el procedimiento final de preparación de células trasplantadas, ya que las células se cultivan en un hidrogel, se

lavan y se utilizan para llenar inmediatamente una jeringa para la utilización, prácticamente no se pierde ninguna célula debido a que la composición se lava en forma de hidrogel sin un procedimiento de lavado que utiliza la centrifugación u otros métodos, y el efecto terapéutico se manifiesta inmediatamente después de la administración a un individuo debido a que se incorporan sustancias bioactivas en poros del hidrogel.

Más específicamente, el método de preparación de una composición que incluye un hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo según la presente invención no incluye la realización de aislamiento celular (tamizado) mediante la utilización de una proteasa, y de esta manera, las células pueden obtenerse eficientemente evitando la pérdida de células de un procedimiento convencional de recolección celular. Además, las células madre obtenidas mediante el método proporcionado por la presente invención pueden administrarse a una zona enfermedad en un estado altamente activo, y las células administradas mantenerse en una zona diana hasta que se haya degradado todo el hidrogel y se haya absorbido por completo, mostrando un efecto terapéutico continuo. Además, la matriz extracelular secretadas a partir de las células madre mesenquimales durante el cultivo, tal como colágeno, laminina, fibronectina, elastina, está completamente presente ya que está incorporado en poros del hidrogel, y de esta manera la capacidad terapéutica de la composición de la presente invención es significativamente superior a la de los agentes terapéuticos convencionales, y puede reducirse el periodo de tratamiento mediante la utilización de la composición de la presente invención.

Los resultados experimentales han mostrado que el hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de la presente invención presenta un periodo de supervivencia celular significativamente más largo que el de los agentes terapéuticos de células madre convencionales debido a que las células madre sobreviven más de una semana en el hidrogel y mantienen la forma de fibroblasto, y pueden potenciar la cicatrización de heridas debido a que se secretan continuamente en una cantidad considerable durante una semana diversos factores de crecimiento y citoquinas que potencian el crecimiento celular y la angiogénesis, y la matriz extracelular secretada se mantiene en el hidrogel, proporcionando diversos tipos de matriz al trasplantarla al cuerpo. Además, la composición de la presente invención no provoca una respuesta inmunitaria, sino que inhibe el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés)-alfa, mitigando la inflamación y ayudando a cicatrizar las heridas, en donde TNF-alfa es una sustancia inflamatoria secretada por células inmunitarias activadas.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es una imagen de un hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. La figura 1a muestra un hidrogel celular formado después del cultivo celular; la figura 1b muestra una jeringa llena con el hidrogel celular mostrado en la figura 1a, y las figuras 1c y 1d muestran la inyección de hidrogel celular contenido en una jeringa a través de una aguja y el mantenimiento de la forma celular tras la inyección.

[Figura 2] La figura 2a muestra una imagen de microscopía (100 aumentos) de un hidrogel con células madre contenido en una jeringa e inyectado inmediatamente mediante la utilización de una aguja de calibre 23, en el que el hidrogel con células madre se preparó mediante el cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo mezcladas con un gel de fibrina preparado mediante una dilución escalonadas de fibrinógeno y una solución de trombina. Se muestra el factor de dilución y la concentración de fibrinógeno y trombina en el hidrogel preparado finalmente.

La figura 2b es una imagen de microscopía (100 aumentos) de un hidrogel con células madre contenido en una jeringa, mantenida a 37 °C, la temperatura corporal del ser humano, durante 24 horas, y después inyectado mediante la utilización de una aguja de calibre 23. Se muestra el factor de dilución y la concentración de fibrinógeno y trombina en el hidrogel preparado finalmente.

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico que muestra la tasa de recuperación celular de las células sometidas a un cultivo secundario mediante un método convencional de recolección celular, lavado, llenado de viales y llenado de jeringa, y la de células sometidas a cultivo en un hidrogel en los momentos de recolección celular, lavado y llenado de jeringa.

[Figura 4] La figura 4 es una imagen de tinción con AO/EtBr que muestra la supervivencia de las células contenidas en un vial tras un cultivo secundario mediante un método convencional (Ejemplo comparativo 1) y el hidrogel con células preparado mediante el cultivo de células en un hidrogel y contenido en una jeringa (Ejemplo 3).

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra la cantidad de colágeno de tipo I de la matriz extracelular incluido en una suspensión celular preparada mediante un método convencional mediante un cultivo secundario, recolección, lavado y llenado (Ejemplo comparativo 1) y en un hidrogel con células preparado mediante cultivo en un hidrogel, lavado y llenado de jeringa (Ejemplo 3), en el que se analizó el colágeno de tipo I mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés).

Descripción de realizaciones

La presente invención proporciona un método de preparación de una composición que incluye un hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una composición que incluye células madre mesenquimales cultivadas en hidrogel, lavadas y después utilizadas inmediatamente para llenar una jeringa, en la que la composición de la presente invención no requiere un tratamiento enzimático en un procedimiento final de preparación de las células que van a trasplantarse, prácticamente no se pierde ninguna célula debido a que la composición se lava en forma de hidrogel sin un procedimiento de lavado que utilice centrifugación u otros métodos, y se manifiesta el efecto terapéutico inmediatamente después de la administración a un individuo debido a que se incorporan sustancias bioactivas en poros del hidrogel.

La presente invención se describe más específicamente a continuación.

La presente invención se refiere a un método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales, en donde el método incluye (a) cultivar células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, 8b) formar un gel mediante mezcla de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en cultivo y una solución de hidrogel, y (c) cultivar el gel y (d) llenar con el gel de la etapa (c) una ampolla, un vial o una jeringa, en donde el hidrogel es cola de fibrina, en el que la cola de fibrina incluye fibrinógeno de una concentración entre 0,9 y 1,6 mg/ml.

En un aspecto, puede utilizarse uno o un compuesto de dos o más seleccionados del grupo de hidrogel que consiste en cola de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, colágeno, ácido algínico, quitosano, celulosa, pectina, un derivado de metacrilato de 2-hidroxiethyl o un copolímero del mismo, óxido de polietileno y alcohol polivinílico, a modo de un hidrogel, más específicamente, puede utilizarse uno o un compuesto de dos o más seleccionados del grupo que consiste en cola de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, colágeno, ácido algínico, celulosa y pectina, y más específicamente, puede utilizarse cola de fibrina.

En una realización de la presente invención, la cola de fibrina puede incluir fibrinógeno a una concentración de entre 0,9 y 1,6 mg/ml. Un resultado experimental ha mostrado que las células no crecen bien o que las células se separan del hidrogel en el caso de que la concentración final de cola de fibrina se encontrase fuera del intervalo indicado anteriormente.

En un aspecto, la cola de fibrina puede incluir trombina a una concentración de entre 1 y 300 U.I./ml, específicamente de entre 5 y 30 U.I./ml, más específicamente, de entre 10 y 15 U.I./ml. No se produce ningún problema de crecimiento celular y adhesividad células-hidrogel dentro del intervalo indicado anteriormente.

En una realización de la presente invención, el método de la presente invención incluye el llenado de una ampolla, un vial o una jeringa con la composición de células madre mesenquimales-hidrogel, según (c). La composición de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo-hidrogel preparada mediante la utilización del método de preparación de la presente invención puede administrarse por vía local mediante la utilización de una jeringa de calibre 20 a 25 inmediatamente después de la preparación.

En una realización de la presente invención, el número de células contadas en el hidrogel con células madre mesenquimales utilizado para llenar una ampolla, un vial o una jeringa en (d) puede ser de 70 % o superior, más específicamente, de 80 % o superior al número de células madre mesenquimales contadas que se han recolectado en (c).

Un resultado experimental ha mostrado que aproximadamente el 70 % de las células preparadas mediante un método convencional se pierden tras el llenado de la jeringa, mientras que solo se pierde el 20 % o menos de las células al utilizar el método de preparación de la presente invención, indicando que la tasa de pérdida de células del método proporcionado mediante la presente invención era significativamente inferior que el de un método convencional.

La presente invención proporciona un agente terapéutico celular que incluye como un ingrediente activo una composición de hidrogel con células madre mesenquimales preparada mediante el método.

La expresión "agente terapéutico celular" utilizada en la presente memoria se refiere a un producto médico destinado al tratamiento, diagnóstico y prevención, que contiene una célula o tejido preparado mediante aislamiento a partir de seres humanos, cultivo y una operación específica. Específicamente, se refiere a un producto médico destinado al tratamiento, diagnóstico y prevención mediante una serie de acciones de multiplicación in vitro y clasificación de células vivas autólogas, alogénicas y xenogénicas, o la modificación de las características biológicas de células por otros medios con el propósito de restaurar la función de células y tejidos. Los agentes terapéuticos celulares se dividen en términos generales en agentes terapéuticos de células somáticas y agentes terapéuticos de células madre, según el nivel de diferenciación de las células. Más específicamente, la presente invención se refiere a un agente terapéutico de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

El término "sujeto" utilizado en la presente memoria se refiere a todos los tipos de animales, incluyendo seres humanos, que ya presentan o que es probable que presenten una enfermedad que puede prevenirse o tratarse mediante la administración del agente terapéutico celular de la presente invención.

Ejemplos

A continuación en la presente memoria se describe la presente invención en mayor detalle en referencia a ejemplos.

Ejemplo 1. Método de cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Habitualmente puede obtenerse un tejido adiposo mediante liposucción, aunque el método de obtención de un tejido adiposo no se encuentra limitada a la misma.

Se separaron del tejido adiposo mediante liposucción las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, mediante el método siguiente. Se lavó el tejido adiposo con el mismo volumen de PBS tres o cuatro veces para eliminar la sangre. Se añadió al tejido adiposo una solución de colagenasa en un volumen igual al del tejido adiposo y se mantuvo en un baño de agua a 37 °C para la reacción. La mezcla resultante se transfirió a un tubo de centrifugación y se sometió a centrifugación a 20 °C y 1500 rpm durante diez minutos. Se separó la capa sobrenadante de lípidos y la capa de solución de colagenasa del fondo se separó cuidadosamente para no agitarla. Se añadió un medio de sustrato a la capa de solución de colagenasa separada y se suspendió, y la mezcla resultante se sometió a centrifugación a 20 °C y 1200 rpm durante cinco minutos. La materia sedimentada era una fracción de estroma-vasos, a partir de la cual se separó el sobrenadante. La fracción de estroma-vasos se suspendió en un medio de sustrato y después se inoculó la suspensión en un recipiente de cultivo. Se llevó a cabo el cultivo a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ durante 24 horas. Tras sacar la solución de cultivo, se lavaron las células con PBS, y después se hizo que proliferasen mediante la utilización de un medio de sustrato, un medio de cultivo preparado mediante la adición de 1 ng/ml de bFGF a un medio de sustrato, o un medio preparado mediante la adición de 5 ng/ml de EGF a un medio de sustrato. Una vez las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo habían crecido hasta un volumen de 80 % a 90 % del recipiente de cultivo, se trataron las células con tripsina, se separaron en forma de células individuales y a continuación se recolectaron.

Ejemplo 2. Determinación de la concentración de cola de fibrina en el hidrogel.

Se añadió una solución de trombina a las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de una concentración de 5×10^5 /ml obtenida en el Ejemplo 1 en proporciones de 1:10, 1:20 y 1:40. Se preparó fibrinógeno (71,5 a 126,5 mg/ml) mediante dilución a factores de dilución de 1:20, 1:40 y 1:80. Se utilizó un sistema de jeringa Duploject para añadir 500 a 700 μ l de las suspensiones celulares que contenían fibrinógeno y trombina a cada pocillo de una placa de 12 pocillos. Tras solidificar por completo el gel, se añadió un medio de cultivo que contenía FBS al 10 % y 1 ng/ml de bFGF, y la mezcla se cultivó a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ durante cinco días. Tras el lavado de las células con DMEM tres veces, se añadió DMEM que contenía 1 ng/ml de bFGF y la mezcla resultante se cultivó a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ durante aproximadamente 12 horas. Tras separar el sobrenadante, se utilizó una jeringa de 1 ml para recolectar un hidrogel con células. Se conectó una aguja de calibre 23 a la jeringa para empujar el hidrogel con células a una placa y se observó el hidrogel con células utilizando un microscopio óptico.

La figura 1a es una imagen del hidrogel con células transferido a una placa, tras el cultivo en una placa de 12 pocillos, indicando que se mantenía el hidrogel formado durante el periodo de cultivo.

La figura 1b es una imagen del hidrogel con células contenido en una jeringa, que indica que se mantiene el estado de gel incluso después de llenar la jeringa con el mismo.

La figura 1c muestra la inyección del hidrogel con células contenido en una jeringa a través de una aguja de calibre 23, y la figura 1d muestra que se mantiene la forma de hidrogel del hidrogel con células incluso después de ser inyectado a través de la aguja de calibre 23.

La figura 2a muestra una imagen de microscopía de los hidrogeles con células preparados en diferentes proporciones, y se utilizaron para llenar una jeringa y se inyectaron en una placa mediante la utilización de una aguja de calibre 23. El crecimiento celular era mejor, ya que el factor de dilución de la cola de fibrina era mayor. El crecimiento celular era bueno y las células y el hidrogel con cola de fibrina estaban bien mezclados entre sí en el caso d que la concentración final de cola de fibrina fue de entre 0,9 y 1,6 mg/ml o de entre 0,4 y 0,8 mg/ml. No se observó una diferencia significativa según la concentración de trombina.

La figura 2b es una imagen de microscopía de un hidrogel con células preparado en diferentes proporciones, utilizado para llenar una jeringa, conservado a 37 °C, que es la temperatura corporal en el ser humano, durante 24 horas, y después inyectado en una placa mediante la utilización de una aguja de calibre 23. Las células y el hidrogel se separaron unas del otro prácticamente por completo a una concentración final de fibrinógeno de entre 1,8 y 3,2 mg/ml, y de entre 0,4 y 0,8 mg/ml, aunque las células y el hidrogel estaban bien mezclados entre sí durante un máximo de 24 horas a una concentración final de fibrinógeno de entre 0,9 y 1,6 mg/ml. No se observó una diferencia significativa según la concentración de la trombina.

Ejemplo 3. Preparación de solución de cultivo de células-hidrogel.

Se añadió una solución de trombina a las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo a una concentración de 5×10^5 /ml obtenidas en el Ejemplo 1 en una proporción de 1:20. Se preparó fibrinógeno mediante dilución a un factor de dilución de 1:40. A continuación, se cultivaron las células, se lavaron y se utilizaron para llenar una jeringa según el Ejemplo 2.

Ejemplo comparativo 1. Preparación mediante la utilización de un método de cultivo de agente terapéutico celular convencional.

Se utilizó el método siguiente como método de cultivo convencional de agente terapéutico celular.

Se cultivaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un recipiente de cultivo. Una vez las células habían crecido hasta un volumen de aproximadamente 80 % del recipiente de cultivo, se separaron las células en forma de células individuales mediante la adición de tripsina-EDTA. Tras desactivar los enzimas mediante la adición de DMEM que contenía FBS, se recolectaron las células en un tubo de centrifuga y se sometieron a centrifugación a 1500 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, se añadió DMEM para suspender las células con el fin de eliminar el FBS. Seguidamente, las células se sometieron nuevamente a centrifugación a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante resultante. Las células se lavaron un total de tres veces, se suspendieron en el lavado final con un agente de suspensión celular de un volumen apropiado y después se utilizaron para llenar un vial. Las células contenidas se transfirieron a una jeringa de 1 ml conectada a una aguja de calibre 23.

Ejemplo experimental 1. Ensayo de medición de la tasa de recuperación celular.

Se añadió un enzima de triple expresión al hidrogel con células en cada etapa del Ejemplo 3 para disolver la cola de fibrina y se contó el número de células. De manera similar, se contó el número de células en cada etapa del Ejemplo comparativo 1.

La figura 3a es un gráfico que muestra la tasa de recuperación de las células en cada etapa del método convencional de preparación del agente terapéutico celular (Ejemplo comparativo 1) en comparación con la etapa de recolección celular inicial (desactivación con tripsina-EDTA), indicando que la tasa de recuperación celular se había reducido en 10 % a 25 % en cada etapa y solo se recuperó aproximadamente el 30 % de las células tras utilizar finalmente las células para llenar una jeringa, en comparación con la etapa inicial de recolección.

La figura 3b es un gráfico que muestra la tasa de recuperación de las células en cada etapa del método de preparación de la presente invención (Ejemplo 3) en comparación con la etapa inicial de recolección celular (tras completar el cultivo celular), indicando que la tasa de recuperación celular se había reducido en 1 % a 5 % en cada etapa y se recuperó más de 80 % de las células tras el llenado final de una jeringa con las células.

Ejemplo experimental 2. Tasa de supervivencia y forma de las células cultivadas en un hidrogel con células.

La tasa de supervivencia de células cultivadas en un hidrogel según el Ejemplo 3 contenidas en una jeringa de 1 ml y conservadas a temperatura ambiente se midió tras 0, 24 y 48 horas, y siete días, mediante tinción de las células con naranja acridina/bromuro de etidio. Las células preparadas mediante un método convencional del Ejemplo 3 y contenidas en un vial se utilizaron a modo de controles.

Tal como se muestra en la figura 4, las células preparadas mediante el método convencional y contenidas en un vial mantuvieron una elevada tasa de supervivencia, de 95 % o superior en la hora 0, aunque las células no consiguieron mantener la forma o se habían agregado entre sí en la hora 24, ya que la membrana celular resultó destruida por muerte celular, y no se observaron prácticamente células en la hora 72, ya que todas las células habían muerto. Por otra parte, las células cultivadas en el hidrogel con células sobrevivieron hasta el día 7 y se mantuvo la forma de fibroblasto.

Ejemplo experimental 3. Matriz extracelular incluida en el hidrogel con células.

El hidrogel con células preparado mediante el cultivo de células en un hidrogel y el llenado de una jeringa de 1 ml con las mismas según el Ejemplo 3 se disolvió mediante el tratamiento con un enzima, y se analizó mediante ELISA la cantidad de colágeno de tipo I. A modo de control se utilizó una suspensión celular preparada mediante el cultivo de células mediante el método convencional del Ejemplo 3 y la introducción en una jeringa de 1 ml.

Tal como se muestra en la figura 5, prácticamente no se incluyó colágeno en la suspensión celular mediante el cultivo de células mediante el método convencional de preparación de agente terapéutico celular, aunque se incluyeron 3 μ g/ml o más de colágeno en el hidrogel con células.

Aplicabilidad industrial

La composición de hidrogel con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo proporcionada por la presente invención presenta una elevada aplicabilidad industrial debido a que las células se cultivan en hidrogel, y se

lavan y se utilizan inmediatamente para llenar una jeringa para la utilización y, de esta manera, podrían no requerir un tratamiento enzimático en un procedimiento final de preparación de células trasplantadas, prácticamente no se pierde ninguna célula debido a que la composición se lava en forma de hidrogel sin un procedimiento de lavado que utiliza centrifugación u otros métodos, y el efecto terapéutico se manifiesta inmediatamente tras la administración al individuo debido a que se incorporan sustancias bioactivas en poros del hidrogel.

5

10

REIVINDICACIONES

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
1. Método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales, en el que el método incluye las etapas de:
(a) cultivar las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo,
(b) mezclar las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en cultivo y una solución de hidrogel para formar un gel,
(c) cultivar el gel, y
(d) utilizar el gel de la etapa (c) para llenar una ampolla, un vial o una jeringa,
en el que el hidrogel es cola de fibrina, en el que la cola de fibrina incluye fibrinógeno a una concentración de entre 0,9 y 1,6 mg/ml.
 2. Método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales según la reivindicación 1, en el que la cola de fibrina incluye trombina a una concentración de entre 1 y 300 U.I./ml.
 3. Método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales según la reivindicación 1, en el que la cola de fibrina incluye trombina a una concentración de entre 10 y 15 U.I./ml.
 4. Método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales según la reivindicación 1, en el que el número de células contado en el hidrogel con células madre mesenquimales contenido en una ampolla, un vial o una jeringa en la etapa (d) es 70 % o más del número de células contado en las células madre mesenquimales recolectadas en la etapa (c).
 5. Método de preparación de una composición de hidrogel con células madre mesenquimales según la reivindicación 1, en el que el número de células contado en el hidrogel con células madre mesenquimales contenido en una ampolla, un vial o una jeringa en la etapa (d) es 80 % o más del número de células contado en las células madre mesenquimales recolectadas en la etapa (c).
 6. Composición para la utilización en el agente terapéutico celular que comprende una composición de hidrogel con células madre mesenquimales preparado mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Figura 1

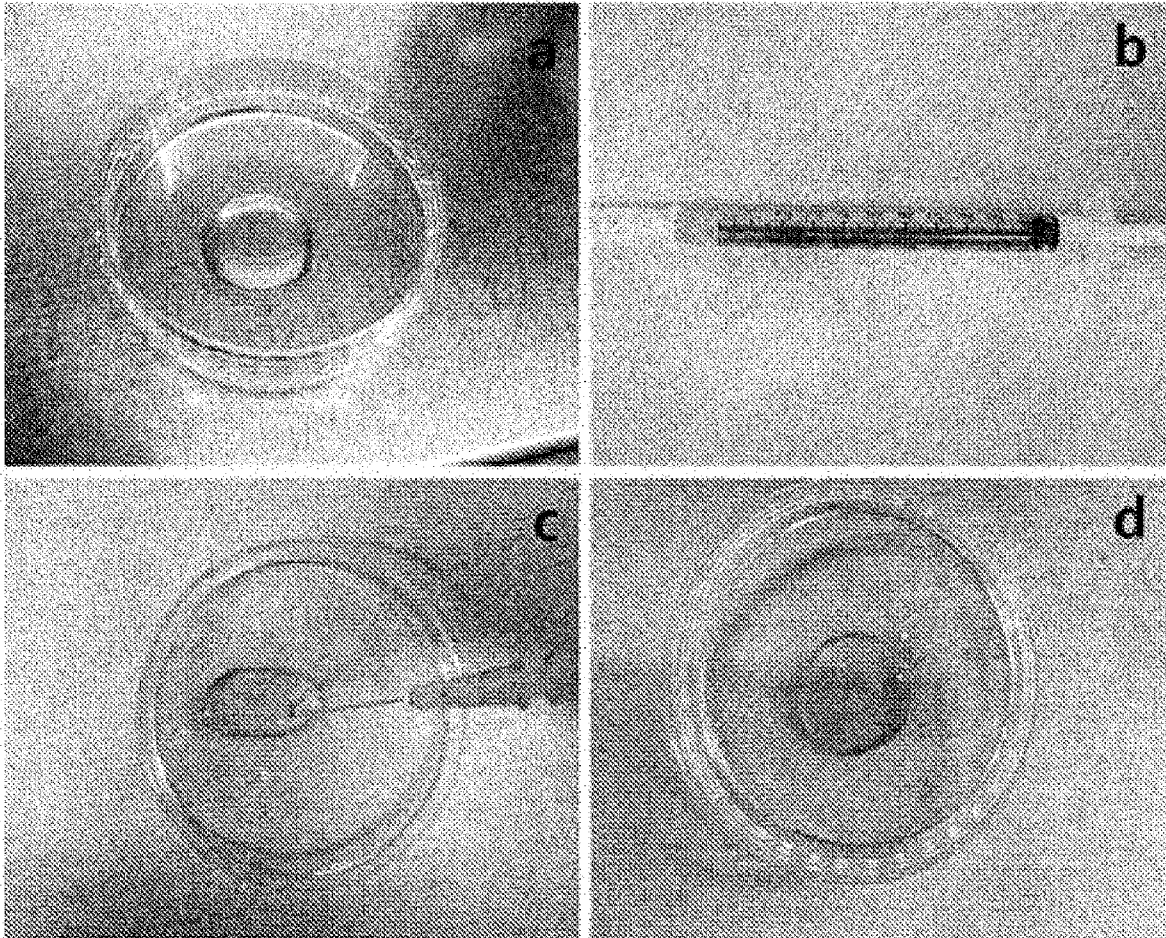


Figura 2a

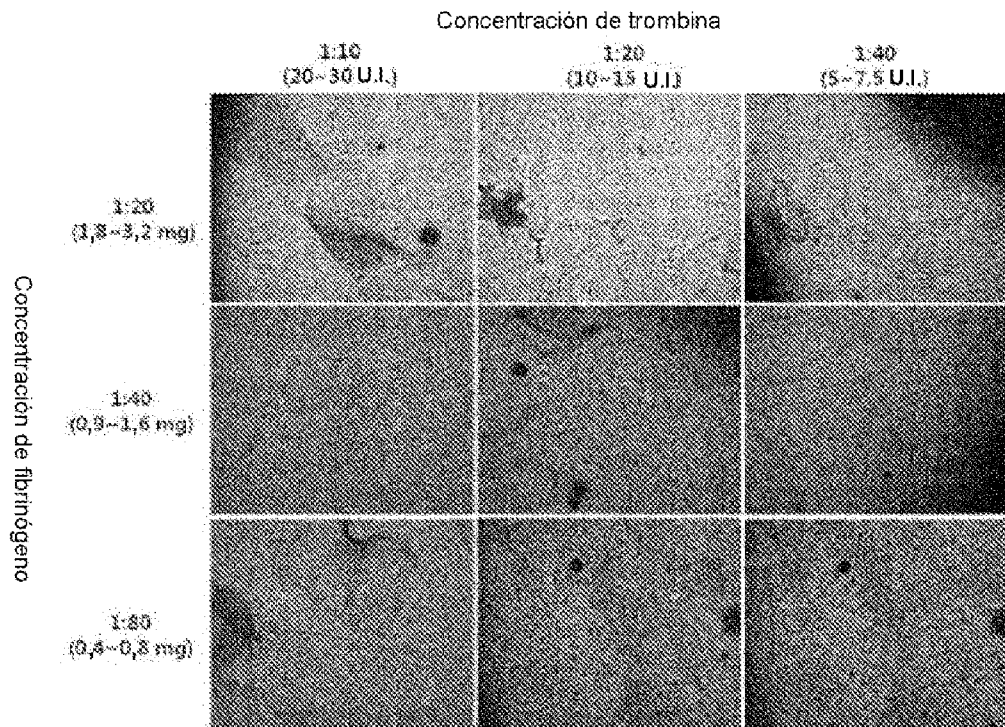


Figura 2b

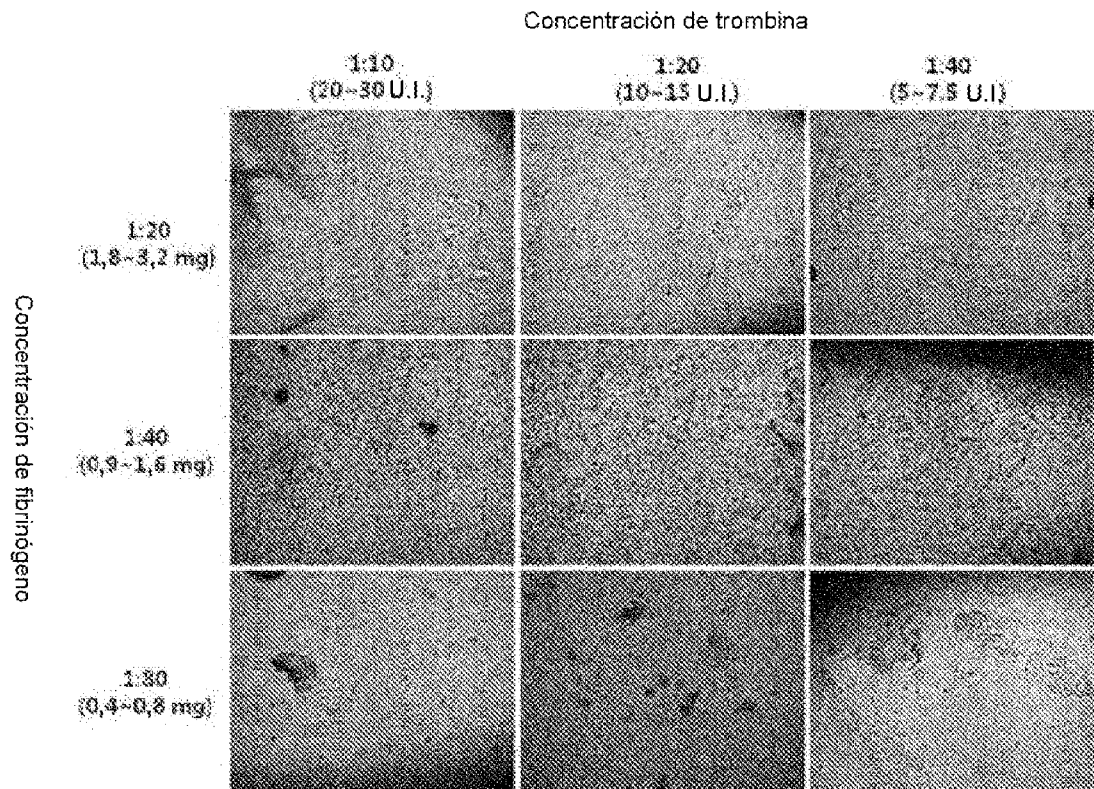


Figura 3

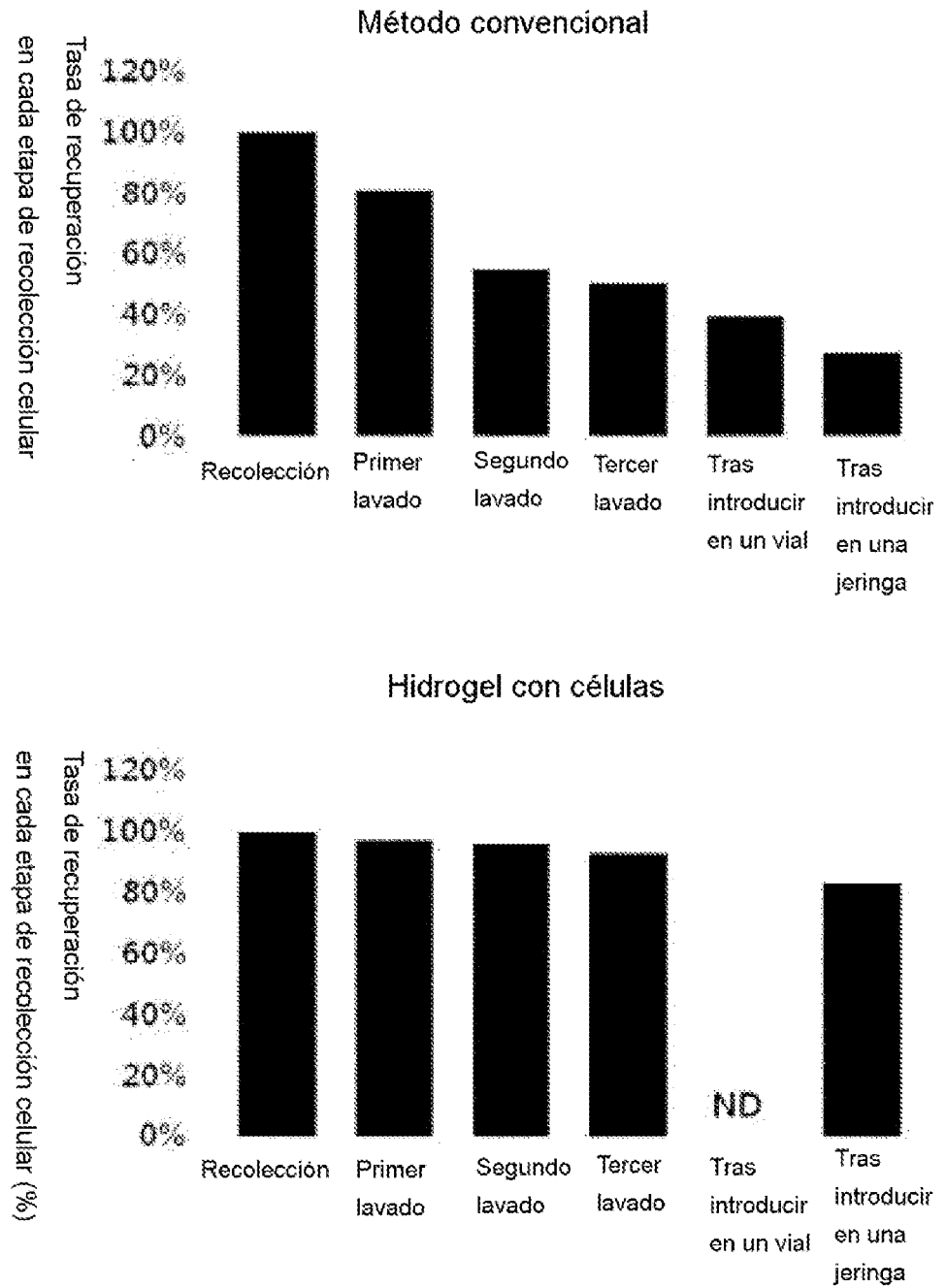


Figura 4

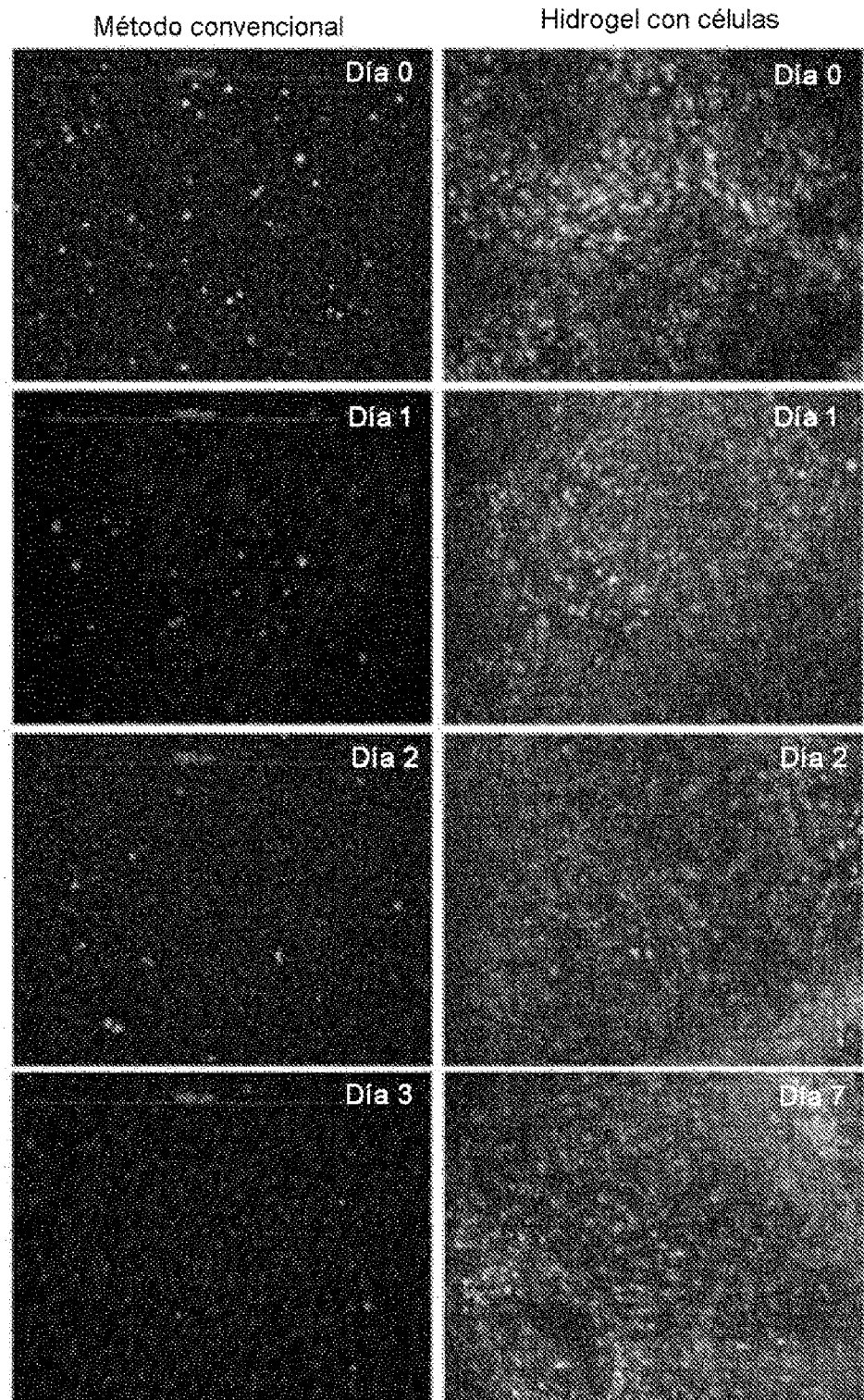


Figura 5

