

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 823**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 35/51 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2019 PCT/US2019/025716**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2019 WO19195506**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2019 E 19781349 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 3773486**

54 Título: **Células estromales mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista**

30 Prioridad:

04.04.2018 US 201862652722 P

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

14.05.2024

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)
2812 Erwin Road, Suite 406
Durham, NC 27705, US**

72 Inventor/es:

**KURTZBERG, JOANNE;
DAWSON, GERALDINE y
SUN, JESSICA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 968 823 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 estromales mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical para su uso en el tratamiento de trastornos del espectro autista

5

ELIMINADO

Antecedentes de la invención**10 Campo de la invención**

La presente descripción se refiere a métodos para tratar el Trastorno del Espectro Autista, particularmente métodos para usar células estromales mesenquimales derivadas de tejido de sangre de cordón humano para tratar el Trastorno del Espectro Autista.

15

Descripción de la técnica relacionada

El autismo o el trastorno del espectro autista (TEA), es un trastorno heterogéneo del desarrollo neurológico que se refiere a un intervalo de afecciones caracterizadas por alteraciones en la comunicación social y la presencia de un intervalo repetitivo y restringido de actividades, con inicio temprano en la vida. El TEA es un diagnóstico clínico basado en la presencia de síntomas conductuales específicos, que pueden ser causados por diferentes combinaciones de influencias genéticas y ambientales. El término “espectro” refleja la amplia variación en desafíos e intensidades que posee cada persona con autismo.

20

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman la prevalencia de TEA para ser de 1 en 68 niños en los Estados Unidos (MMWR Surveill Summ 2014; 63:1-21). Esto incluye 1 en 42 niños varones y 1 en 189 niñas. La mayoría de las personas con TEA no pueden vivir de forma independiente y requieren apoyo o adaptaciones de por vida. Por consiguiente, se estima que el coste de vida útil de soporte de un individuo con TEA es de \$1,4 millones. El coste estimado aumenta a \$ 2,4 millones para aquellos que también tienen una discapacidad intelectual. Se estima que 50.000 adolescentes con autismo se convierten en adultos y pierden los servicios escolares para el autismo cada año. Alrededor de un tercio de las personas con autismo permanecen no verbales. Alrededor del cuarenta por ciento de las personas con autismo tienen una discapacidad intelectual. Ciertos problemas médicos y mentales de salud con frecuencia acompañan al autismo. Estos incluyen trastornos gastrointestinales (GI), convulsiones, alteraciones del sueño, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), ansiedad y fobias. Los enfoques actuales de tratamiento para TEA incluyen medicamentos, terapia conductual, terapias ocupacionales y del habla, y un soporte educativo y vocacional especializado. La intervención conductual temprana intensiva se asocia con resultados sustancialmente mejorados, pero incluso con tal intervención, muchos individuos con TEA permanecen significativamente afectados. Si bien los tratamientos actuales son compatibles, se centran en la gestión de secuelas con terapias físicas, medicamentos y cirugía. Los tratamientos médicos actualmente disponibles, tales como medicamentos psicotrópicos, están destinados a mejorar los síntomas comórbidos asociados, tales como irritabilidad, pero no abordan los síntomas centrales del TEA. A la luz de esto, existe una gran necesidad insatisfecha de nuevos tratamientos eficaces dirigidos a síntomas centrales del TEA.

25

30

35

40

Ambos factores genéticos y ambientales contribuyen a la etiología del TEA (de la Torre-Ubieta L, et al. Nat Med 2016; 22:345-361; Mandy W, Lai MC. J. Child Psychol Psychiatry 2016; 57:271-292; Sahin M, Sur M. Science 2015; 350). En los últimos años, a pesar de los avances en la secuenciación y el análisis genéticos que identificaron varias mutaciones *de novo*, las variantes del número de copias (CNV) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que se asocian con un mayor riesgo de TEA, se estima que menos del 20 % de los casos pueden atribuirse a un factor de riesgo genético conocido (Abrams BS, Geschevium DH. Arch Neurol 2010; 67(4):395-399). Varios factores ambientales también se asocian con un mayor riesgo de TEA, que incluye la exposición al teratógeno materno, las toxinas ambientales y la edad paterna avanzada. Finalmente, la inflamación y la disfunción inmunitaria están implicadas en la etiología del TEA.

45

50

Aunque la fisiopatología exacta es desconocida, las observaciones incluyen un funcionamiento sináptico anormal en áreas del cerebro (Gao R, Penzes P. Curr Mol Med 2015; 15:146-167; Volk L, y col. Annu Rev Neurosci 2015; 38:127-149), anomalías de la materia blanca (Wolff JJ, y col. Am J Psychiatry 2012; 169:58 9-600) y neuroinflamación (Young AMH, y col. Mol Autism 2016; 7:1-8). La patogénesis de la patología inmunitaria en los cerebros de pacientes con TEA puede deberse a la sobreexpresión de redes génicas relacionadas con el sistema inmunitario (Voineagu I, y col. Nature 2011; 474:38 0-384), presencia de anticuerpos maternos al tejido cerebral fetal (Braunschweig D, y col. Transl Psychiatry 2013; 3:eE277), niveles atípicos de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) en el líquido cefalorraquídeo (IL-6, TNF- α) Varga DL, y col. Ann Neuro 2005; 57:67-81), y una activación microglial excesiva que conduce a rutas aberrantes de conectividad neuronal (Morgan JT, y col. Biol Psychiatry 2010; 68:368-376; Suzuki K, y col. JAMA Psychiatry 2013; 70:49-58). Como tales, los enfoques terapéuticos que afectan la modulación inmunitaria o la regulación de la conectividad neuronal son dianas lógicas para nuevos tratamientos para esta población.

60

65

Varias observaciones diferentes apoyan un papel de la activación y/o desregulación inmunitaria en la etiología del TEA. Estudios epidemiológicos múltiples demostraron una mayor tasa de TEA en niños nacidos de madres que tenían una infección durante el embarazo. Esta asociación es consistente a través de los países y períodos de tiempo, que se ha informado tan pronto como la década de 1970 después de una pandemia de rubéola en los Estados Unidos (Chess S. *J Autism Child Schizophr* 1971; 1(1):33-47) y durante las décadas en Dinamarca (Atladdottir HO, y col. *J Autism Dev Disord* 2010; 40(12):1423-1430), Suecia y otros países. La fiebre materna, el tratamiento con antibióticos, los niveles elevados de marcadores inflamatorios y la infección con varios microbios diferentes se han asociado con un mayor riesgo para el desarrollo de TEA en el niño, lo que indica que es probable que la respuesta inmunitaria a la infección sea más causante del propio agente infeccioso. En consecuencia, los modelos animales produjeron descendencia con fenotipos de TEA mediante la inducción de la activación inmunitaria en las madres gestantes (Harvey L, Boksa P. *Dev Neurobiol* 2012; 72(10):1335-1348; Malkova NV, y col. *Brain Behav Immun* 2012; 26(4):607-616). Mecanismos fisiopatológicos potenciales incluyen alteraciones en la tolerancia inmunitaria materna-fetal (a través de anticuerpos maternos y/o inmunidad celular) e inflamación cerebral fetal, que conducen a cambios en los perfiles de citocinas cerebrales fetales y la activación microglial que pueden ser perjudiciales para el neurodesarrollo. Se obtuvo evidencia de un aumento de los números de microglía y una mayor activación microglial en TEA mediante estudios de autopsia, imágenes cerebrales de tomografía por emisión de positrones (PET) y modelos animales. Además, se ha descrito un funcionamiento anormal en aspectos del sistema inmunitario en el cerebro (como la microglía que tiene la tarea de proporcionar soporte a las sinapsis neuronales) (Takango T. *Dev Neurosci* 2015; 37(3): 195-202; Zantomio D, y col. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 52:172-177). TEA se asocia con niveles aumentados de citocinas en plasma, genes regulados positivamente asociados con la activación microglial, inflamación localizada y activación patológica de astrocitos (Goines PE, Ashwood P. *Clin Rheumatol* 2013; 33(11):1611-1619). Cabe señalar que ahora se reconocen muchas citocinas y moléculas asociadas clásicamente con la regulación inmunitaria también juega un papel en el neurodesarrollo normal. Esta doble funcionalidad puede resultar un vínculo importante en la asociación de cambios relacionados con el sistema inmunitario y un neurodesarrollo anormal en el TEA.

La microglia juega papeles críticos pero incompletamente entendidos en la propagación y resolución del daño del sistema nervioso central (SNC). Estas células modulan la neuroinflamación, producen factores que regulan las actividades de los astrocitos, los oligodendrocitos y las neuronas, y los desechos claros para proporcionar un entorno para los oligodendrocitos para comenzar a remielinizar las neuronas. En ratones, la microglia surge de un conjunto único de precursores replicantes en el cerebro que originalmente se deriva del saco vitelino extraembrionario en los primeros pasos del desarrollo fetal. Los monocitos de sangre circulante derivados de médula ósea constituyen otra fuente potencial de células fagocíticas infiltrantes que pueden exacerbar o mejorar el daño del SNC. Aunque recientemente se ha descrito una ruta para la circulación de monocitos entre la linfa y el parénquima cerebral, un gran número de monocitos circulantes no entran en el cerebro de ratón adulto, no lesionado, sino que pueden infiltrarse en el SNC después de la agresión, tal como la irradiación cerebral, la quimioterapia o la lesión, las afecciones desmielinizantes o el estrés crónico. En algunos modelos, estos monocitos sanguíneos infiltrantes pueden activar la inflamación y participar en eventos desmielinizantes. En otros, los monocitos de sangre pueden facilitar la remielinización.

Las sinapsis son puntos de comunicación entre neuronas, lo que permite el paso organizado de información mediante señalización eléctrica y química. Si bien hay un período de sinaptogénesis intensificada temprano en el desarrollo, las sinapsis conservan la plasticidad en toda la vida, lo que permite, por ejemplo, el aprendizaje y la memoria. El desarrollo y el mantenimiento de la sináptica normal son esenciales para la función neuronal adecuada, y las anomalías en cualquier proceso están asociadas con múltiples condiciones de desarrollo neurológico, incluyendo TEA. Las mutaciones en genes que codifican proteínas sinápticas se han implicado en TEA. Además, estudios en humanos y animales demostraron una reducción en el tamaño, el número y la morfología de las columnas dendríticas y un aumento de la morfología de la columna inmadura en TEA y trastornos relacionados con el autismo (Phillips M, Pozzo-Miller L. *Neurosci Lett* 2015; 601:30-40). También es probable que los factores ambientales también puedan influir en los cambios sinápticos. Estas alteraciones pueden conducir a una conectividad neuronal problemática, tal como conectividad de bajo alcance y conectividad de corto alcance (Gescheviento DH, Levitt P. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17(1):103-111; Maximo JO, y col. *Neuropsychol Rev* 2014; 24(1):16-31).

En conjunto, estas observaciones sugieren que los factores de riesgo tanto ambientales como genéticos pueden contribuir al desarrollo de TEA al causar desregulación inmunitaria y/o conectividad neuronal anormal que afectan negativamente el desarrollo cerebral normal. Por lo tanto, las terapias inmunomoduladoras pueden tener un papel en el tratamiento de niños con TEA. Se sabe que las células estromales mesenquimales (MSC) tienen capacidades inmunomoduladoras, se usan en la clínica para numerosas aplicaciones y tienen un perfil de seguridad favorable. Las MSC también pueden tener potencial para tratar eficazmente la patología subyacente y los síntomas resultantes de niños con TEA.

Las células estromales mesenquimales (MSC) son un grupo heterogéneo de células pluripotentes indiferenciadas que pueden aislarse de varios tejidos diferentes, lo que incluye la médula ósea, el tejido adiposo y los tejidos del nacimiento (sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical, placenta). Si bien las MSC pueden dar lugar a tipos de tejido mesodérmico, que incluyen hueso, cartílago y grasa, se cree que su mecanismo de acción primario es el resultado de efectos inmunomoduladores y paracrinos. Las MSC demostraron una multitud de efectos inmunomoduladores tanto en respuestas inmunitarias humorales como mediadas por células. Estos incluyen, pero no se limitan a, inhibir la

proliferación de células B, T, NK, dendríticas y microgliales, disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y bloquear el reclutamiento de neutrófilos. A pesar de su capacidad para modular la respuesta inmunitaria, las propias MSC tienen baja inmunogenicidad. Esto permite que las MSC se usen en el entorno alogénico a través de las barreras HLA, sin la necesidad de un emparejamiento de HLA del receptor del donante típico de otros tipos de células. De hecho, en una revisión de 13 estudios en humanos de administración de MSC alogénica intravenosa, no hubo informes de toxicidad infusional; Lalu MM, y col. PLoS One 2012; 7(10):e47559, lo que respalda la noción de que las MSC son “inmunoprivilegiadas” y pueden evitar la alorecogición inmunológica. Cuando se utiliza como célula terapéutica, las MSC ejercen efectos a través de la señalización trófica. Las MSC no se injertan en el receptor.

El tratamiento de TEA generalmente es compatible y a menudo es multimodal. Los enfoques incluyen medicamentos, terapia conductual, terapias ocupacionales y del habla y un soporte educativo y vocacional especializado. Todos los tratamientos médicos disponibles actualmente, tales como medicamentos psicotrópicos, están destinados a mejorar los síntomas comórbidos asociados, tales como irritabilidad, pero no son modificadores de la enfermedad. A pesar de los avances en el diagnóstico temprano y las terapias conductuales, se necesitan tratamientos más eficaces para niños con TEA, y existe una gran necesidad insatisfecha de tratamientos médicos mejor, más eficaces y modificadores de la enfermedad para TEA. Las terapias de células estromales mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hCT-MSC) pueden tener potencial para aliviar los síntomas de TEA mediante la modulación de procesos inflamatorios en el cerebro. Obsérvese que Yong-Tao LV y col (J. Translational Medicine, 11 (1) p. 196 (2013)) describe el trasplante de células mononucleares de sangre de cordón umbilical humano y células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical en autismo. El documento WO 2017/160986 describe células madre mesenquimales con una eficacia mejorada. Jessica M Sun y col (Pediatric Research, 83 (1-2) pp. 364-371 (2017)) describe terapia celular para diversos trastornos del sistema nervioso central tales como enfermedades metabólicas hereditarias y autismo. Huajiang Dong y col (Am. J. of Translational Research. 10 (3) pp. 901-906 (2018) describe trasplantes de células madre mesenquimales de cordón umbilical (UC-MSC) para parálisis cerebral. El documento WO 2017/204231 describe un agente terapéutico para el daño cerebral que incluye las células derivadas del ombligo.

Resumen de la invención

La presente descripción proporciona el beneficio de eliminar la restricción de tener una unidad de sangre de cordón umbilical autóloga almacenada o disponible de otro modo.

La presente invención se define en las reivindicaciones 1-9. En un aspecto, la invención reivindicada proporciona células estromales mesenquimales derivadas de tejido de cordón alogénico humano (hCT-MSC) para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene o se sospecha que tiene un trastorno del espectro autista, en donde en dicho método se administra al paciente hCT-MSC en una cantidad total de $6,0 \times 10^6$ células/kg, y se administra en 2 a 3 dosis en 6 meses. En ciertas realizaciones, las hCT-MSC se administran sistémicamente. En algunas realizaciones, se administran por vía intravenosa (por ejemplo, mediante infusión intravenosa durante 30 minutos).

En algunas realizaciones, la dosis comprende más del 90 % de células CD73+ y CD90+. En algunas realizaciones, la dosis comprende menos de 10 % de células CD45+, CD3+ o CD1+.

En otro aspecto, la invención reivindicada proporciona hCT-MSC para su uso en un método para evaluar la efectividad terapéutica del tratamiento con hCT-MSC en un paciente que padece un trastorno del espectro autista, en donde dicho método comprende: (a) realizar una o más pruebas apropiadas en el paciente para establecer puntuación del valor de referencia de comportamiento y/o biomarcador; (b) administrar al paciente hCT-MSC en una cantidad total de $6,0 \times 10^6$ células/kg, administradas en 2 a 3 dosis en 6 meses; (c) reevaluar al paciente en uno o más momentos después de la administración de hCT-MSC para la misma o más pruebas conductuales y/o de biomarcadores establecidas en (a); y (d) comparar los resultados en (c) con la(s) puntuación(es) del (los) valor(es) de referencia establecida(s) en (a). Opcionalmente, las pruebas conductuales realizadas en (a) y (c) comprenden uno o más de: Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-II (VABS-II), Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-III (VABS-III), Escala de impresión clínica global (CGI), Inventario de comportamiento del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI), Prueba de vocabulario expresivo de imágenes de una palabra-4 (EOWPVT-4), Lista de verificación de conductas aberrantes, Cuestionario de experiencias sensoriales, Escala de conductas repetitivas, Escalas de inteligencia (Escala Mullen de aprendizaje temprano o Stanford-Binet), Análisis del entorno del lenguaje, Inventario de síntomas ATN GI e Índice de estrés parental. Opcionalmente, la reevaluación del paciente en (c) se realiza en uno o más momentos que comprende: 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses y 18 meses, 24 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años o indefinidamente después de la administración.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el diseño del estudio para el estudio de fase I de hCT-MSC en niños con TEA.

La Figura 2 muestra un resumen de los eventos adversos observados durante el estudio de hCT-MSC de Fase I. Se relacionó un total de 3/53 (5,7 %) de eventos con el producto de estudio-hipotensión y reacción relacionada con la infusión.

Las Figuras 3A - 3B muestran diseños generales de estudio para un estudio de fase II de hCT-MSD en niños con TEA.

La Figura 4 muestra un análisis de citometría de flujo ilustrativo de la población de hCT-MSD para infusión. Las poblaciones son mayores de 90 % de CD73+ y CD90+, con menos de 10 % de CD45+, CD3+ o CD31+.

Descripción detallada de la invención

ELIMINADO

ELIMINADO

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprende” e “incluir” y variaciones (por ejemplo, “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”) se entenderá que implica la inclusión de un componente, característica, elemento o paso o grupo de componentes establecidos, características, elementos o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.

Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Los intervalos se pueden expresar en la presente invención como “aproximadamente” un valor particular y/o a “aproximadamente” otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o al otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro criterio de valoración como independientemente del otro criterio de valoración.

Como se usa en la presente memoria, el término “poner en contacto” incluye el contacto físico de al menos una sustancia a otra sustancia.

Como se usa en la presente memoria, “tratamiento”, “terapia” y/o “régimen de terapia” se refieren a la intervención clínica realizada en respuesta a una enfermedad, trastorno o afección fisiológica (por ejemplo, trastorno del espectro autista) manifestado por un paciente o al que un paciente puede ser susceptible. El objetivo del tratamiento incluye el alivio o prevención de los síntomas, ralentizar o detener la progresión o empeoramiento de una enfermedad, trastorno o afección y/o la remisión de la enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, trastorno del espectro autista).

El término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad suficiente para efectuar resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos o deseables. Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” puede determinarse por un equipo experto de profesionales de la salud, y puede incluir el uso de pruebas conductuales, pruebas de biomarcadores y pruebas neurofisiológicas o neuroimágenes. Por ejemplo, las pruebas de comportamiento pueden incluir, entre otras, la Lista de verificación del DSM-5, las Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-III (VABS-III), la Escala de impresión clínica global (CGI), el Inventario de comportamiento del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI), el Inventario de comportamiento del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI), Prueba de vocabulario con imágenes de una palabra-4 (EOWPVT-4), evaluación de la conducta para niños: subescala de habilidades sociales, lista de verificación de conductas aberrantes, Cuestionario de experiencias sensoriales, escala de conducta repetitiva, escalas de inteligencia (escalas Mullen de aprendizaje temprano o Stanford-Binet), escalas de capacidad diferencial, segunda edición (DAS-II), análisis del entorno del lenguaje, evaluación psiquiátrica en edad preescolar, lista de verificación de conducta aberrante, síntomas ATN GI Inventario, prueba 4 de vocabulario expresivo con imágenes de una palabra (EOWPVT-4) e índice de estrés parental. Las evaluaciones clínicas adicionales pueden incluir, entre otras, la Entrevista de diagnóstico de autismo revisada (ADI-R), el Programa de observación de diagnóstico de autismo, segunda edición (ADOS-2), la Interacción entre padres e hijos (PCI) con Noldus EthoVision, la Lista de verificación de comportamiento aberrante-Comunidad (ABC-C), el Inventario de calificación de comportamiento de la función ejecutiva-Versión preescolar (BRIEF-P), el Inventario de calificación del comportamiento de la función ejecutiva (BRIEF), el Cuestionario de experiencias sensoriales, versión 2.1 (SEQ 2.1), la Herramienta de evaluación de exposiciones en la vida temprana (ELEAT) y las Escalas de síntomas gastrointestinales del Inventario de calidad de vida pediátrica (PedsQL). Las pruebas neurológicas objetivas administradas pueden incluir, pero no se limitan a, Seguimiento de la mirada ocular del estímulo Social (EGT), electroencefalograma (EEG), análisis de visión por ordenador (CVA) y obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) del cerebro. En algunas realizaciones, las pruebas pueden incluir pruebas equivalentes o sustitutas, que actualmente están disponibles, o estarán disponibles en el futuro.

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren tanto a animales humanos como no humanos. El término “animales no humanos” de la descripción incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente

humano que se sospecha que tiene, tiene o padece, un trastorno del espectro autista. En algunas realizaciones, el sujeto humano es un niño. En ciertas realizaciones, el sujeto humano es un adulto.

Como se usa en la presente memoria, los términos “trastorno del espectro del autismo” y “autismo” se usan indistintamente y se refieren a cualquier gama de afecciones mentales, generalmente presentes desde la infancia temprana, que se caracterizan por dificultad para comunicar y formar relaciones con otras personas y en el uso de conceptos del lenguaje y resumen. El autismo puede diagnosticarse en cualquier edad; sin embargo, los síntomas generalmente aparecen en los primeros dos años de vida. Según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5), las personas con TEA pueden tener dificultad para la comunicación e interacción con otras personas, intereses restringidos y comportamientos repetitivos, y síntomas que impactan a la capacidad de la persona para funcionar correctamente en la escuela, el trabajo y otras áreas de vida.

Las células estromales mesenquimales (MSC) son un grupo heterogéneo de células pluripotentes indiferenciadas que pueden aislarse de varios tejidos diferentes, lo que incluye la médula ósea, el tejido adiposo y los tejidos de nacimiento (sangre del cordón umbilical, tejido del cordón umbilical y placenta). Si bien las MSC pueden dar lugar a tipos de tejido mesodérmico, que incluyen hueso, cartílago y grasa, se cree que su mecanismo de acción primario es el resultado de efectos inmunomoduladores y paracrinos. Las MSC han demostrado una multitud de efectos inmunomoduladores en las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células. Estos incluyen, pero no se limitan a, inhibir la proliferación de células B, T, NK, dendríticas y microgliales, disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y bloquear el reclutamiento de neutrófilos. A pesar de su capacidad para modular la respuesta inmunitaria, las propias MSC tienen baja inmunogenicidad. Esto permite que las MSC se usen en el entorno alógeno a través de las barreras HLA, sin la necesidad de un emparejamiento de HLA del receptor del donante típico de otros tipos de células. De hecho, en una revisión de 13 estudios en humanos de administración de MSC alógena intravenosa, no hubo informes de toxicidad infusional; Lalu MM, y col. PLoS One 2012; 7(10):e47559), apoyando la idea de que las MSC tienen “privilegios inmunológicos” y pueden evitar el alorreconocimiento inmunológico. Cuando se utiliza como célula terapéutica, las MSC ejercen efectos a través de la señalización trófica. Ellas no se injertan en el receptor. El mecanismo exacto de acción de las MSC en TEA es el sujeto de investigaciones en curso, pero hay varios medios potenciales a través de los cuales las MSC pueden ejercer efectos terapéuticos, que incluyen inmunomodulación mediada por células, neuroprotección mediada por moléculas y restauración de circuitos neurológicos funcionales.

Como se usa en la presente memoria, el término “alógena” se refiere a la totalidad o una parte (por ejemplo, una célula, un tejido, un órgano, etc.) de una entidad que se administra desde otra entidad que es la misma especie, pero es genéticamente diferente. Dado que una entidad alógena es genéticamente diferente, la entidad alógena puede provocar una reacción inmune en una entidad (receptor) a la que se administra la aloentidad; sin embargo, se cree que las MSC tienen privilegios inmunológicos y, por lo tanto, pueden evitar el alorreconocimiento inmunológico. Esto significa que los pacientes receptores son capaces de tolerar la introducción de hCT-MSC alógenas sin provocar una respuesta inmunitaria inflamatoria, y que las hCT-MSC alógenas pueden sobrevivir durante períodos prolongados de tiempo sin que se produzca rechazo.

Tratamiento del trastorno del espectro autista por hCT-MSC

Los métodos descritos en la presente memoria pueden configurarse por el experto en la técnica para satisfacer la necesidad deseada. En general, los materiales, métodos y aparatos descritos permiten métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno del espectro autista o un sujeto que padece un trastorno del espectro autista que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de hCT-MSC y/o un componente o mezcla de componentes del mismo, de manera que el trastorno del espectro autista es tratado.

Debe entenderse que, como se usa en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, el término “hCT-MSC” pretende abarcar cualquier formato y/o un componente o mezcla de componentes del mismo como se describe en la presente descripción, ya sea específicamente indicado o no.

El paciente puede ser cualquier animal humano o no humano. En ciertas realizaciones, el paciente es humano. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano por debajo de 18 años de edad, o en cualquier intervalo de edad que cae dentro de este intervalo de edad más amplio. En ejemplos no limitantes, el paciente puede tener de 2 años a 18 años, de 2 años a 17 años, de 2 años a 16 años, de 2 años a 15 años, de 2 años a 14 años, de 2 años a 13 años de 2 años a 12 años, de 2 años a 11 años, de 2 años a 10 años, de 2 años a 9 años, de 2 años a 8 años, de 2 años a 7 años, de 2 años a 6 años, 2 años a 5 años, 2 años a 4 años, 2 años a 3 años, 3 años a 18 años, 3 años a 17 años, 3 años a 16 años, 3 años a 15 años, 3 años a 14 años, 3 años a 13 años, 3 años a 12 años, 3 años a 11 años, 3 años a 10 años, 3 años a 9 años, 3 años a 8 años, 3 años a 7 años, 3 años a 6 años, 3 años a 5 años, 3 años a 4 años, 4 años a 18 años, 4 años a 17 años, 4 años a 16 años, 4 años a 15 años, 4 años a 14 años, 4 años a 13 años, de 4 años a 12 años, de 4 años a 11 años, de 4 años a 10 años, de 4 años a 9 años, de 4 años a 8 años, de 4 años a 7 años, de 4 años a 6 años de edad, 4 años a 5 años, 5 años a 18 años, 5 años a 17 años, 5 años a 16 años, 5 años a 15 años, 5 años a 14 años, 5 años a 13 años, 5 años a 12 años, 5 años a 11 años, 5 años a 10 años, 5 años a 9 años, 5 años a 8 años, 5 años a 7 años, 5 años a 6 años, 6 años a 18 años, de 6 a 17 años, de 6 a 16 años, de 6 a 15 años, de 6 a 14 años, 6 años a 13 años, 6 años a 12 años, 6 años a 11 años, 6 años a 10 años, 6 años a 9 años, 6 años a

8 años, 6 años a 7 años, 7 años a 18 años, 7 años a 17 años, 7 años a 16 años, 7 años a 15 años, 7 años a 14 años, 7 años a 13 años, 7 años a 12 años, 7 años a 11 años, de 7 a 10 años, de 7 a 9 años o de 7 a 8 años.

5 En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano hasta aproximadamente 45 años de edad, o en cualquier intervalo de edad que cae dentro del intervalo más amplio de edad de aproximadamente 1 año de edad a aproximadamente 45 años de edad. Por ejemplo, de aproximadamente 18 a aproximadamente 45 años de edad, de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 años de edad, de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 años de edad, de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 años de edad, de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 años de edad, o de aproximadamente 40 a aproximadamente 45 años de edad. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano de cualquier edad entre 1 y 45 años de edad. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 años.

15 Las hCT-MSK pueden administrarse a un paciente mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluida la administración sistémica. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa o técnicas de infusión. Las técnicas de infusión pueden implicar la administración de las hCT-MSK a través de una aguja o catéter. Típicamente, la infusión significa que las hCT-MSK se administran por vía intravenosa o subcutánea. En algunas realizaciones, las hCT-MSK se administran sistémicamente. En determinadas realizaciones, las hCT-MSK se administran por vía intravenosa (*es decir*, mediante inyección intravenosa (IV).

20 El estudio se centró en (1) la seguridad de una, dos o tres dosis intravenosas de hCT-MSK en niños jóvenes con TEA, y (2) la sensibilidad al cambio y la viabilidad de la administración de varias herramientas de evaluación diferentes en niños jóvenes con TEA. A la primera cohorte de tres (3) pacientes se administró una dosis única de hCT-MSK. A la segunda cohorte de tres (3) pacientes se administró dos dosis de hCT-MSK, dada dos (2) meses de diferencia. A la 25 tercera cohorte de seis (6) pacientes se administró tres dosis de hCT-MSK, con un intervalo de dos (2) meses entre cada dosis. El criterio de valoración principal fue seguridad, para el cual se evaluaron reacciones de infusión aguda e incidencia de infecciones durante cada infusión, dentro de las 24 horas posteriores a cada infusión, 7-10 días después de cada infusión, 2 meses, 4 meses y 6 meses después de cada infusión, y 6 y 12 meses después de la infusión final de hCT-MSK. La evaluación de los eventos adversos a través del período de infusión y 12 meses después de la 30 infusión final indicó que el tratamiento fue seguro y bien tolerado. Se informaron eventos adversos, con 10 de 12 pacientes que informaron al menos un evento adverso. Los eventos adversos fueron leves, esperados, y no relacionados con el producto de estudio. No se informaron eventos adversos graves. Un criterio de valoración secundario evaluó las medidas de resultados específicos del TEA al valor de referencia del estudio, antes de la infusión inicial de hCT-MSK y 6 meses después de la infusión inicial de hCT-MSK. Se observaron mejoras significativas en el 35 comportamiento de los pacientes en las medidas de habilidades de comunicación social informadas por los padres (Escala de comportamiento adaptativo de Vineland) para los pacientes cuyo coeficiente intelectual no verbal era más alto al inicio del estudio.

Preparación de hCT-MSK

40 Las células estromales mesenquimales derivadas de cordón umbilical humano pueden prepararse, conservarse y prepararse para administración mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos, las hCT-MSK pueden prepararse en una sala limpia cortando el tejido del cordón umbilical en trozos y triturando y digiriendo con hialuronidasa, DNasa, colagenasa y papaína. La suspensión celular resultante se puede poner en placa en cultivo, 45 cultivar hasta confluencia para establecer el cultivo P0 y criopreservarse. Los cultivos P1 y P2 pueden cultivarse en condiciones similares y retirarse del material de cultivo. El producto final puede derivarse de los cultivos P2 que se recolectan en plasmalyte con albúmina de suero humano al 5 %, se lavan y se criopreservan en criomarcadores de compartimento que contienen 50-100 millones de células en una concentración final de DMSO al 10 % con dextrano. El día de la administración, se puede descongelar un compartimento, se diluye en 10-40 mL de solución de plasmalyte 50 1V, se coloca en una jeringa o bolsa y se transporta al lado de la cama para su administración.

Administración de hCT-MSK

55 La vía de administración de la sangre de cordón umbilical puede seleccionarse por un experto en la técnica basándose en las enfermedades tratadas y los resultados deseados. En ciertas realizaciones, las hCT-MSK se administran mediante infusión intravenosa periférica (IV).

60 Las hCT-MSK de la descripción pueden administrarse en una dosis única o en dosis múltiples (*p. ej.*, dos, tres o cuatro o más dosis únicas por tratamiento) durante un período de tiempo (*p. ej.*, días, semanas o meses), y puede administrarse en dos o más dosis, cada dosis administrada al menos aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas de diferencia, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 meses de diferencia, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses de diferencia, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 4 meses de diferencia, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 5 meses de diferencia, o 65 aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses de diferencia), aunque en la invención reivindicada, la administración está en una cantidad total de $6,0 \times 10^6$ células/kg, y se administra en 2 a 3 dosis en 6 meses.

En ciertas realizaciones, cada dosis de hCT-MSK de la descripción puede administrarse durante un período de tiempo en el intervalo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 75 minutos, por ejemplo, durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 60 minutos, o durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 50 minutos, o durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, o durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos, o durante aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 70 minutos, o durante aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 60 minutos, o durante aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 50 minutos, o durante aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 40 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 70 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 50 minutos, o durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 40 minutos. En algunas realizaciones, la dosis se administra durante 30 minutos.

Una dosis terapéuticamente eficaz de hCT-MSK comprende aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 6×10^6 células/kg de peso corporal en el momento de la administración; p. ej., aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/kg, o aproximadamente $1,5 \times 10^6$ a aproximadamente 3×10^6 células/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/kg, o aproximadamente 2×10^6 células/kg, p. ej., aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $5,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, o aproximadamente $6,0 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, aunque en la invención reivindicada, la dosis terapéuticamente eficaz de hCT-MSK comprende un total de 6×10^6 células/kg de peso corporal, y se administra en 2-3 dosis durante un período de aproximadamente 6 meses. Un experto en la técnica reconocerá que el volumen adecuado de la dosis puede seleccionarse en función de la vía de administración deseada. Por ejemplo, la administración intravenosa puede usar volúmenes de dosis en el intervalo de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 50 mL; por ejemplo, aproximadamente 5 mL a aproximadamente 40 mL, o aproximadamente 5 mL a aproximadamente 30 mL, o aproximadamente 5 mL a aproximadamente 20 mL, o aproximadamente 5 mL a aproximadamente 15 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 40 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 30 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 20 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 15 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 50 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 40 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 30 mL, o aproximadamente 30 mL a aproximadamente 50 mL, o aproximadamente 30 mL a aproximadamente 40 mL, o aproximadamente 40 mL a aproximadamente 50 mL.

En la invención reivindicada, se administran hCT-MSK (por ejemplo, mediante infusión) a un total de 6×10^6 células/kg de peso corporal, y se administran en 2-3 dosis durante un período de 6 meses, p. ej., mediante (p. ej., infusión de) tres dosis de 2×10^6 células/kg de peso corporal, cada infusión recibió dos meses de separación. También se describe, pero no parte de la invención reivindicada, hCT-MSK se pueden administrar por infusión de una dosis única de 2- o 3- o 4 o 6×10^6 células/kg de peso corporal, o mediante infusión de dos dosis de 2 o 3×10^6 células/kg de peso corporal, cada infusión administrada aproximadamente dos meses, o mediante infusión de dos dosis de 3×10^6 células/kg de peso corporal, cada infusión administrada aproximadamente tres meses, o mediante infusión de tres dosis de 3×10^6 células/kg de peso corporal, cada infusión proporcionó aproximadamente dos a tres meses.

En ciertas realizaciones donde se usa la administración intravenosa periférica, los fluidos IV pueden administrarse a aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 veces en mantenimiento. Por ejemplo, los fluidos IV pueden administrarse después de la infusión a aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5 veces en mantenimiento, o aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 veces en mantenimiento. Los fluidos de mantenimiento IV pueden administrarse durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos después de la infusión de hCT-MSK. Por ejemplo, pueden administrarse fluidos IV de mantenimiento después de la infusión, *por ejemplo*, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 45 minutos a aproximadamente 60 minutos.

Puede usarse cualquier fluido intravenoso adecuado para el mantenimiento después de la infusión de hCT-MSK. En ciertas realizaciones, el fluido IV de mantenimiento es una solución salina o solución lactato de Ringer. En ciertas realizaciones, el fluido IV de mantenimiento es una solución salina normal al 0,25 %. En ciertas realizaciones, el fluido IV de mantenimiento es una solución salina normal al 0,5 %.

Se utilizan múltiples evaluaciones para determinar tanto la viabilidad de la administración como la utilidad como criterio de valoración para futuros ensayos clínicos de fase II y III. Estas evaluaciones o pruebas incluyen pruebas conductuales, pruebas de biomarcadores y pruebas neurofisiológicas o de neuroimágenes. Pruebas de comportamiento realizadas o administradas incluyen, entre otras, la Lista de verificación del DSM-5, las Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-II (VABS-II), las Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-III (VABS-III), la Escala de impresión clínica global (CGI), Inventario de conducta del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI), Prueba de vocabulario expresivo de imágenes de una palabra-4 (EOWPVT-4), Subescala de evaluación de la conducta para niños-Habilidades sociales, Lista de verificación de conductas aberrantes, Cuestionario de experiencias sensoriales, Escala de conductas repetitivas, Escalas de inteligencia (Escalas Mullen de aprendizaje

temprano o Stanford-Binet), Escalas de capacidad diferencial, segunda edición (DAS-II), Análisis del entorno del lenguaje, Evaluación psiquiátrica en edad preescolar, Lista de verificación de conductas aberrantes, Inventario de síntomas gastrointestinales de ATN, Prueba 4 de vocabulario expresivo con imágenes de una palabra (EOWPVT-4) e Índice de estrés parental. Evaluaciones clínicas adicionales pueden incluir, entre otras, la Entrevista de diagnóstico de autismo revisada (ADI-R), el Programa de observación de diagnóstico de autismo, segunda edición (ADOS-2), la Interacción entre padres e hijos (PCI) con Noldus EthoVision, la Lista de Comportamiento Aberrante-Comunidad (ABC-C), el Inventario de Calificación de Comportamiento de la Función Ejecutiva-Versión Preescolar (BRIEF-P), el Inventario de Calificación de Comportamiento de la Función Ejecutiva (BRIEF), el Cuestionario de Experiencias Sensoriales, Versión 2.1 (SEQ 2.1), la herramienta de evaluación de exposiciones en la vida temprana (ELEAT) y las escalas de síntomas gastrointestinales del Inventario de calidad de vida pediátrica (PedsQL). Las pruebas neurológicas objetiva administradas pueden incluir, pero no se limitan a, Seguimiento de la mirada ocular del estímulo Social (EGT), electroencefalograma (EEG), análisis de visión por ordenador (CVA) y obtención de imágenes por resonancia magnética cerebral (MRI). Además de las pruebas mencionadas anteriormente, las evaluaciones y pruebas también pueden incluir cualquier prueba actual o futura o equivalente.

En un aspecto de la invención reivindicada, uno o más ensayos de comportamiento apropiados y pruebas de biomarcadores objetivo se realizan en un paciente con TEA antes de administrar la cantidad eficaz de hCT-MSK como se identifica por la invención reivindicada, para establecer puntuaciones conductuales y de biomarcadores iniciales. El paciente se reevalúa después de la administración de la cantidad eficaz de hCT-MSK para la misma o más pruebas conductuales y/o pruebas de biomarcadores objetivo (y opcionalmente, además, pruebas neurofisiológicas o neuroimágenes). Los resultados de las pruebas realizadas después de la administración de las hCT-MSK se comparan con los resultados iniciales de las mismas pruebas realizadas antes de la administración de las hCT-MSK. En algunas realizaciones, la entrevista para padres VABS-III es el criterio de valoración conductual principal. En algunas realizaciones, CGI, PDDBI y EOWPVT son criterios de valoración de comportamiento secundarios clave. En algunas realizaciones, la prueba de biomarcadores objetivo es EGT.

El paciente se reevalúa en uno o más momentos posteriores a la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK, que incluyen, pero no se limitan a, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 3 años, 4 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años o más después de la administración de las hCT-MSK. En ciertas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar indefinidamente. En algunas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar a los 3 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se reevalúa a los 6 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar a los 9 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar a los 12 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se reevalúa a los 18 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar a los 24 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK. En algunas realizaciones, el paciente se vuelve a evaluar a los 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses después de la administración de una cantidad eficaz de hCT-MSK.

Ahora se explican ciertos aspectos de la descripción a través de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

45 Materiales y métodos

Fabricación de células estromales mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hCT-MSK)

50 Fuente de células

Las hCT-MSK se fabricaron según cGMP en una instalación de sala limpia ISO 7 a partir de células alogénicas de tejido del cordón umbilical digerido que se expande en cultivo, se criopreserva y se almacena..

55 Método de recogida/recuperación

Las hCT-MSK se fabricaron a partir de tejido del cordón umbilical extraído de la placenta de partos a término normales en los que la sangre del cordón umbilical del bebé se donó al Carolinas Cord Blood Bank, un banco público de sangre del cordón umbilical acreditado por FACT y con licencia de la FDA en el Centro Médico de la Universidad de Duke. previo consentimiento informado por escrito de la madre del bebé. Se extrajo tejido del cordón umbilical de las placentas de bebés varones nacidos por cesárea electiva después de un embarazo normal a término. La donante materna completó los cuestionarios de detección de donantes y el laboratorio de detección de donantes certificado por CLIA de la Cruz Roja Estadounidense en Charlotte, Carolina del Norte, analizó la sangre materna para detectar enfermedades transmisibles. Las donantes deben ser elegibles para la donación a un banco de sangre de cordón umbilical público para uso alogénico. Después de la expulsión de la placenta y el cordón umbilical, se drenó asépticamente la sangre del cordón umbilical de la placenta. Luego, el cordón se secó y se limpió con cloropreps, se separó de la base de la placenta, se colocó en un frasco estéril que contenía Plasmalyte A y se transportó al laboratorio

de procesamiento de células GMP de Robertson Clinical and Translational Cell Therapy (CT2) a temperatura ambiente en un recipiente validado.

Selección y prueba de donantes

5 La selección y las pruebas de los donantes se realizaron según los procedimientos operativos estándar del Carolinas Cord Blood Bank para cumplir con todos los requisitos de 21 C.F.R. Parte 1271. La detección y las pruebas están actualizadas con las recomendaciones y están aprobadas por la FDA bajo el número de licencia biológica 1870. Las donantes maternas de sangre de cordón umbilical fueron examinadas y analizadas para detectar VIH-1, VIH-2, virus de la hepatitis B (VHB, antígeno de superficie y núcleo), virus de la hepatitis C (VHC), Treponema pallidum (sífilis), ECJ (sólo detección), virus linfotrópico T humano tipos 1 y 2 (HTLV-1, HTLV-2), Chagas y CMV. Las pruebas de ácido nucleico para el virus del Nilo HIV-1/2/O, VHB, VHC y el Nilo Occidental también se realizaron en sangre materna. También se realizó la detección para el virus de Zika.

15 Debido a que el tejido del cordón umbilical proviene de donantes que dieron su consentimiento para su donación al Carolinas Cord Blood Bank, se sometieron a pruebas de detección de donantes y pruebas de enfermedades infecciosas según estos procedimientos operativos estándar del Carolinas Cord Blood Bank. Las muestras maternas asociadas a la sangre de cordón umbilical y las muestras de MSC de tejido del cordón umbilical se retendrán como muestras de referencia para pruebas futuras como parte de este estudio.

20 Sistema de banco de células

Banco de células maestro (P0).

25 El banco de células maestras (MCB) para hCT-MSc se derivó del tejido del cordón umbilical que se digirió, el cultivo se expandió durante 7 a 14 días para generar aproximadamente 2×10^7 células y se congeló en un número apropiado de alícuotas de 5×10^6 células por vial a una concentración de 1×10^7 células/mL en Cryostor CS10 (Biolife, Bothell, WA). Más específicamente, el tejido se digirió mediante el uso de un cóctel de enzimas que incluye colagenasa de grado GMP (Roche, Basilea, Suiza), papaína (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), hialuronidasa de grado USP (Halozyme Therapeutics, San Diego, CA), ADN de grado GMP (EMD Millipore, Billerica, MA) y el Miltenyi Biotec GentleMacmedis Octo Dissociator (Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, el tejido se cortó en piezas de 4 gramos, se colocó en tubos GentleMacs estériles con el cóctel de enzimas y se digirió. Después de la digestión, el material resultante se colocó en cultivo durante 7-14 días en el lisado de plaquetas Prime XV MSC XSFM (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y GMP de grado GMP (Compass Biomedical, Cleveland, OH). Las células se cosecharon por tripsinización y se crioconservaron como se describió anteriormente. Las células se caracterizaron por citometría de flujo mediante el uso de los siguientes marcadores: CD90, CD73, CD105, CD166, CD31, CD45 y CD3. Los recuentos celulares se realizaron usando el Cellometer (Nexcelem, Lawrence, MA) para determinar la viabilidad, la concentración total de células y la concentración de células viables. La prueba de esterilidad mediante el uso del sistema BacT/Alert (BioMerieux, Durham, NC) se realizó en sobrenadantes de los cultivos de MSC. Las muestras también se conservaron para la prueba de micoplasma y endotoxina. Cada lote para el MCB debe cumplir los criterios en la Tabla 1 a continuación para calificar para una expansión posterior.

Tabla 1: Especificaciones para la inclusión en la MCB (P0) y WCB (P1)

Prueba	Especificación:
Elegibilidad de los donantes	Se ha determinado que el donante es elegible según los resultados de las pruebas y exámenes de detección del donante.
Esterilidad (BacT/ALERT)	Negativo
Endotoxina	< 5 EU/mL
Micoplasma	Negativo
Viabilidad	≥ 70 % Viable
Composición celular (Identidad)	> 90 % CD90+
	> 90 % CD73+
	< 10 % CD45+
	< 10 % CD31+
	< 10 % CD3+
	CD105+ solo para información
	CD166+ solo para información

Banco de células de trabajo (P1)

El banco de células de trabajo (WCB) se generó a partir del MCB (P0). Se descongelaron un número apropiado de viales del MCB y se colocaron en Frascos HYPER (Corning Life Sciences, Corning, NY) y se expandieron durante 5-7 días para generar aproximadamente $2,75 \times 10^8$ células. Las células P1 se cosecharon y se criopreservaron en un número apropiado de crioviales de 5 mL a una concentración de 1×10^7 células/mL en Cryostor CS10. Las células se caracterizaron por citometría de flujo usando los siguientes marcadores CD90, CD73, CD166, CD31, CD45, CD3 y CD105. Los recuentos celulares se realizaron usando el Cellometer para determinar la viabilidad, la concentración total de células y la concentración de células viables. Se realizaron pruebas de esterilidad mediante el uso del sistema BacT/Alert en sobrenadantes de cultivo. Las muestras también se conservaron para la prueba de micoplasma y endotoxina. Cada lote para el WCB debe cumplir los criterios en la Tabla 1 anterior para calificar para una expansión posterior.

Material de estudio Final (P2)

El material final del estudio se generó a partir del WCB (P1). Se descongelaron un número apropiado de viales del WCB y se colocaron en 20 Frascos HYPER y se expandieron durante 5-7 días para generar aproximadamente $1,25 \times 10^9$ células. Las células P2 se cosecharon y se criopreservaron en bolsas de compartimentos CryoPRO 5 (SynGen, Sacramento, CA) a una concentración de 1×10^7 a 2×10^7 células/mL en Plasmalyte A (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) con 5 % de HSA (Grifols, Barcelona, España) y DMSO al 10 % (Akron Biotech, Boca Raton, FL). Las células se caracterizaron por citometría de flujo usando los siguientes marcadores CD90, CD73, CD166, CD31, CD45, CD3 y CD105. Los recuentos celulares se realizaron usando el Cellometer para determinar la viabilidad, la concentración total de células y la concentración de células viables. Se realizaron pruebas de esterilidad mediante el uso del sistema BacT/Alert en sobrenadantes de cultivo. Las muestras también se conservaron para la prueba de micoplasma y endotoxina. Cada lote debe cumplir los criterios de la Tabla 2 a continuación para ser calificado para uso clínico.

Tabla 2: Criterios de calificación de hCT-MSK para cultivos P2

Prueba	Especificación:
Esterilidad (BacT/ALERT)	Negativo
Endotoxina	< 5 EU/mL
Micoplasma	Negativo
Viabilidad	≥ 70 % Viable
Composición celular (Identidad)	> 90 % CD90+
	> 90 % CD73+
	< 10 % CD45+
	< 10 % CD31+
	< 10 % CD3+
	Informe % CD105+ (solo para información)
	informe % CD166+ (solo para información)
Mutación P53	Mutación no detectada
Células maternas	Negativo
Potencia	Supresión ≥ 70 % de proliferación de células T en un ensayo MLC de tercera parte

Tabla 3: Reactivos usados en la fabricación

Nombre/Descripción del artículo	Fabricante	Grado
Plasmalyte A	Baxter Healthcare - Deerfield, IL	USP
Hylenex (NDA 21859/S-023)	Halozyme Therapeutics - San Diego, CA	USP
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco	Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA	GMP
Benzonasa nucleasa	EMD Millipore - Billerica, MA	GMP
Papaina	Worthington Biochemical - Lakewood, NJ	Certificados libres de materiales animales

Nombre/Descripción del artículo	Fabricante	Grado
Liberase	Roche - Basilea, Suiza	GMP
Solución salina equilibrada de Hanks	GE Healthcare - Cardiff, Reino Unido	GMP
Prime-XV MSC Expansión XSFM	Irvine Scientific Santa Ana, CA	GMP
Lisado Plaquetas	Compass Biomedical - Cleveland, OH	GMP
TrypLE Select 10X	Invitrogen Carlsbad, CA	GMP
Cryosstor CS10	Biolife - Bothell, WA	GMP
Albúmina de suero humano al 25 %	Grifold - Barcelona, España	Farmacéutico para inyección
DMSO/dextrano (55 % p/v de DMSO, 5 % p/v de Dextrano 40)	Akron Biotech - Boca Raton, FL	GMP

Preparación de células estromales mesenquimales derivadas del tejido del cordón umbilical humano (hCT-MSC)

20 Método de recogida de células/ Procesamiento/ Condiciones de cultivo

25 Toda la fabricación se realizó en la instalación de GMP CT2. La sala limpia se mantuvo monitorizada y se limpió según el protocolo, y todos los miembros del personal fueron entrenados adecuadamente y de propiedad adecuada. El entrenamiento se documentó como por SOP. Los días siguen los protocolos aprobados mantenidos por MasterControl, el sistema de seguimiento de documentos validado para la instalación de GMP CT2. Los siguientes SOP describen batas y limpieza y están disponibles tras solicitud; CT2-SOP-003, CT2 Acceso a la instalación y uso; CT2-SOP-004, Procedimientos de vestimenta para la instalación CT2 GMP; CT2-SOP-006, Limpieza y Saneamiento de Áreas Clasificadas en Instalación CT2 GMP; CT2-SOP-009, Transferencia de Materiales, Productos, Equipos y Residuos dentro y fuera de la Instalación CT2 GMP.

30 El material de partida de hCT-MSC fue tejido del cordón umbilical que fue donado por madres después de su consentimiento informado por escrito. El tejido del cordón umbilical utilizado para la fabricación se cosechó de un término placenta obtenido a partir de una administración de sección C electiva no complicada en la sala de operaciones y asignó un identificador de código de barras ISBT de 12 dígitos en el momento de la recolección. Una vez que el tejido del cordón llegó en la instalación de GMP CT2, se asignó un nuevo identificador de código de barras ISBT de 12 dígitos específico para la instalación de GMP CT2 y se rastreó a lo largo del proceso de fabricación de hCT-MSC. Este nuevo identificador de código de barras está vinculado al número ISBT original que se asignó al tejido en el sitio de recolección. La selección y las pruebas de los donantes deben cumplir con las especificaciones para la autorización de sangre del cordón umbilical para que hCT-MSC se almacene en el banco.

40 Procesamiento del tejido del cordón umbilical (CT2-MSC-002) para generar P0 (MCB)

45 El día cero de fabricación se inició al recibir tejido del cordón umbilical de un donante masculino. El tejido del cordón umbilical fue entregado a las instalaciones de CT2 por un mensajero capacitado en un contenedor que contiene Plasmalyte A. Se realizó una inspección visual al recibirlo para garantizar que el tejido del cordón umbilical cumpla con los requisitos para su procesamiento. Se asignó un código de barras de 12 dígitos al tejido del cordón umbilical en el momento de la recolección y se unió a un nuevo identificador de código de barras ISBT de 12 dígitos que se asignó una vez que el tejido llegó a la instalación CT2. Se emitió un número suficiente de etiquetas de código de barras para todos los registros de lotes, las impresiones de instrumentos, los tubos, los viales, etc. y se conciliaron al final de la ejecución de fabricación.

50 En una cabina de bioseguridad, el tejido del cordón umbilical se pesó y se cortó en piezas de aproximadamente 4 gramos. Las piezas de tejido del cordón umbilical se colocaron en tubos estériles con el cóctel de enzimas que contenía Liberase, Hylenex, Papain y Benzonasa (ver Tabla 3). A continuación, las piezas de tejido se trituraron y se digirieron en el disociador de Miltenyi Biotec Octo GentIM. Después de la disociación, el tejido digerido se filtró, se centrifugó y se sembró en una capa CellSTACK (Corning Life Sciences, Corning, NY) que contenía XSFM Prime XV MSC suplementado con lisado plaquetario al 1 % y se incubó a 37 °C con CO2 al 5 %.

60 Intercambios de medios y cosecha (CT2-MSC-003) (MCB)

65 Dentro de los primeros tres días de cultivo, el CellSTACK se retiró brevemente de la incubadora y se observó bajo el microscopio para cualquier evidencia visual de contaminación y/o cualquier morfología inusual o crecimiento atípico. Después, todo el medio se retiró del matraz y se reemplazó con un volumen igual de XSFM de expansión de MSC de XV Prime nueva y lisado plaquetario al 1 %. El matraz se devolvió a la incubadora hasta el día 7.

El día 7, el CellSTACK se retiró brevemente de la incubadora y se observó bajo el microscopio para cualquier evidencia visual de contaminación y/o cualquier morfología inusual o crecimiento atípico. Si no se alcanzó una confluencia del 80-90 % del cultivo, todo el medio se retiró del matraz y se reemplazó con un volumen igual de medio de expansión de MSC Primario reciente y lisado plaquetario al 1 %. El matraz se devolvió a la incubadora.

5

El ACK P0 CellST se recogió entre los días 7 y 14, una vez alcanzado el 80-90 % de confluencia. El día de la cosecha, el CellSTACK se retiró de la incubadora y se observó bajo el microscopio para cualquier evidencia visual de contaminación y/o cualquier morfología inusual o crecimiento atípico. Las células se retiraron del CellSTACK usando 1X TrypLE, se contaron y se criopreservaron en Cryostor CS10. Las células se congelaron en alícuotas de aproximadamente 5×10^6 células a una concentración de 1×10^7 células/mL en crioviales de 2 mL mediante el uso de un congelador de velocidad controlada. Las células se almacenaron en fase de vapor en un congelador de nitrógeno líquido. El medio de cultivo residual se inoculó en botellas de cultivo aeróbicas y anaeróbicas para pruebas de esterilidad. Se retiró una alícuota de células para la caracterización celular, micoplasma y prueba de endotoxinas.

10

15 Descongelación y expansión de P0 para generar P1 (CT2-MSC-005) (WCB)

Los viales P0 se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se sembraron cuatro Frascos HYPER con $1,7 \times 10^6$ células cada una en medio de expansión Prime XV MSC. Las células se incubaron más tiempo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Se recogieron las partículas Frascos HYPER entre los días 5-7, una vez que se alcanzó el 80-90 % de confluencia.

20

Cosecha de P1 (CT2-MSC-005) (WCB)

El día de la cosecha, los Frascos HYPER se retiraron de la incubadora y se observaron bajo el microscopio para cualquier evidencia visual de contaminación y/o cualquier morfología inusual o crecimiento atípico. Las células se retiraron de los Frascos HYPER usando 1 x TrypLE, se contaron y se criopreservaron en viales en Cryostor CS10. Las células se congelaron en alícuotas de aproximadamente $4,5 \times 10^7$ células a una concentración de 1×10^7 células/mL en crioviales de 5 mL mediante el uso de un congelador de velocidad controlada. Las células se almacenaron en fase de vapor en un congelador de nitrógeno líquido. El medio de cultivo usado se inoculó en botellas de cultivo aeróbicas y anaeróbicas para pruebas de esterilidad. Se retiró una alícuota de células para la caracterización celular, micoplasma y prueba de endotoxinas.

25

30

Descongelación y expansión de P1 (WCB) para generar P2 (producto de estudio) (CT2-MSC-005 FRF4)

Los viales P1 se descongelaron y se sembraron veinte frascos HyHyper con $1,7 \times 10^6$ células cada una en medio de expansión Prime XV MSC. Las células se incubaron más tiempo a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Se recogieron los P2 Frascos HYPER entre los días 5-7 una vez al 80-90 % de confluencia.

35

Cosecha Final de P2 (producto de estudio) (CT2-MSC-005 FRM5)

El día de la cosecha, se retiraron los frascos HYPER de la incubadora y se observaron bajo el microscopio para cualquier evidencia visual de contaminación y/o cualquier morfología inusual o crecimiento atípico. Los frascos se lavaron con PBS y las células se retiraron de los Frascos HYPER usando 10x TrypLE. A continuación, las células se lavaron con Plasmalyte/ 5 % de HSA, se contaron y se formularon en 20 mL de Plasmalyte/ 5 % de HSA. SynGen CryoPRO (SynGen, Sacramento, CA) se usó para la adición de DMSO al 55 % en Dextrano-40 (Akron Biotech, Boca Raton, FL) y para transferencia a los conjuntos de bolsa de compartimento CryoPRO 5. Aproximadamente $2,5 \times 10^8$ a 5×10^8 se añadieron células por bolsa a una concentración de 1×10^7 a 2×10^7 células/mL en 25 mL de plasmalal/5 % HSA/10 % DMSO. Por lo tanto, cada compartimento contenía 50 a 100 millones de células. El producto se criopreservó usando un congelador de velocidad controlada y se almacenó en fase de vapor en un congelador de nitrógeno líquido. El medio de cultivo residual se inoculó en botellas de cultivo aeróbicas y anaeróbicas para pruebas de esterilidad. Se retiró una alícuota de células para probar micoplasma, endotoxinas, caracterización celular y ensayos funcionales. El panel de inmunofenotipificación incluye CD73 y CD90 para confirmar un fenotipo de MSC, y CD45, CD3 y CD31 para demostrar poca o ninguna contaminación con células hematopoyéticas o endoteliales. Las especificaciones son > 90 % de CD73+ y CD90+, con < 10 % CD45+, CD3+ o CD31+ (véase la Figura 4). Los siguientes marcadores se incluyen solo para información: CD105 y CD166. Se incubaron alícuotas de la suspensión celular con anticuerpos marcados con fluorescencia y se lavaron con tampón PBS/HSA. Los datos se adquirieron en un BD FACSCanto equipado con software DiVa y se analizaron mediante el uso del software FCS Express, validados previamente para uso clínico. El porcentaje de células que reaccionan con cada marcador se informa en el certificado de análisis.

40

45

50

55

60

65

Se realizaron pruebas funcionales en una muestra de las células P2. Se esperaba que las hCT-MSC se diferenciaron en tejido óseo, adiposo y cartilaginoso. Se examinaron las células para determinar la diferenciación ósea mediante la expresión de osteocalcina, para tejido adiposo usando la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP-4), y para el cartílago usando agregcano. Las células también se probaron en un ensayo mitógeno para examinar la capacidad de las células para suprimir las respuestas de las células T a los mitógenos. Se descartó cualquier lote que no cumpla con las especificaciones de prueba.

Temporización del proceso y almacenamiento intermedio

5 Las hCT-MSc se fabricaron a partir de tejido del cordón umbilical en una serie de tres pasos que generan un banco de células maestro, un banco de células de trabajo y el producto de estudio. El producto para cada paso se congeló y se almacenó en fase de vapor en el congelador de nitrógeno líquido. Un programa de estabilidad para el producto congelado fue parte del desarrollo del producto.

Formulación Final

10 El día del tratamiento del sujeto, las células se descongelaron, se diluyeron 1:1 en Plasmalyte A/5 % de HSA y se extrajo una alícuota para el recuento celular, la viabilidad y las pruebas de esterilidad. El recuento celular y la viabilidad se obtuvieron usando el Nexcelom Cellometer Auto 2000. Si las células eran $\geq 70\%$ viables, el volumen final del producto se ajustó para suministrar 2×10^6 células/kg al sujeto del estudio. Las células se transfirieron a una jeringa luer-lock y se suministraron al lado de la cama. Plasmalyte es una solución isotónica estéril, no pirogénica, que no contiene agentes antimicrobianos. Se inoculó cualquier suspensión celular retirada en botellas de cultivo aeróbicas y anaeróbicas para pruebas de esterilidad.

20 El producto hCT-MSc es estable durante hasta 4 horas a temperatura ambiente. La estabilidad para el producto hCT-MSc descongelado en el excipiente final se documentó en la fabricación de lotes de procesamiento piloto de MSC en el informe de instalación de GMP CT2 (CT 2-2016-019-P).

25 La jeringa se empaquetó en un contenedor de envío para su transporte a temperatura ambiente hasta el punto de atención para la administración al paciente. Tras la revisión QA de los registros de lotes de producción y el certificado de análisis, el producto se liberó para su transporte a la clínica como por SOP. Tanto el Certificado de Análisis como el formulario de Cadena de Custodia acompañan al producto hCT-MSc. La jeringa que contenía el producto hCT-MSc se administró al sujeto del estudio a su llegada a la clínica.

Identidad

30 La composición celular de hCT-MSc se determina mediante inmunofenotipificación usando un panel de anticuerpos de etiqueta de fluorescencia contra CD73 y CD90 para confirmar un fenotipo de MSC, y CD45, CD3 y CD31 para demostrar que hay poca o ninguna contaminación con células hematopoyéticas o endoteliales. CD105 y CD166 se usan solo como información. Las especificaciones son $> 90\%$ de CD73+ y CD90+, con $< 10\%$ CD45+, CD3+ o CD31+ (véase la Figura 4). Los datos se adquieren en un BD FACSCanto equipado con software DiVa. Los datos se analizan usando el software FCS Express previamente validado para uso clínico. El porcentaje de células que expresan cada marcador se informa en el certificado de análisis. Se han establecido especificaciones de liberación para CD73, CD90, CD45, CD3 y CD31 basados en datos no clínicos, los resultados de las corridas de procesamiento piloto y la entrada del equipo médico relacionado con la seguridad del sujeto. El porcentaje de todos los demás marcadores en el panel se informa con fines informativos. Como surgen los ensayos de potencia candidatos, los datos de inmunofenotipificación se correlacionarán de modo que las especificaciones puedan establecerse antes de las fases IND posteriores.

45 Como MSC, se espera que estos productos derivados de tejido del cordón umbilical demuestren una capacidad para diferenciarse en células óseas, adiposas y de cartílagos. Se controla la capacidad de diferenciación de cada producto celular *in vitro*, usando condiciones de cultivo bien definidas. Finalmente, las células se examinan mediante microscopía de fluorescencia. Los osteocitos diferenciados se distinguen por su expresión de osteocalcina. Los adipocitos diferenciados se distinguen por su expresión de la proteína 4 de unión a ácidos grasos. Finalmente, los condrocitos diferenciados se distinguen por su expresión de agrecano.

50 Para controlar su capacidad para la modulación inmunitaria, la hCT-MSc se analizó para determinar su capacidad para suprimir respuestas de células T a mitógenos. Para explorar los mecanismos potenciales detrás de esta supresión, se midieron las respuestas celulares a interferón- γ . Cuando se exponen a esta señal proinflamatoria, hCT-MSc aumentó su expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1). Al mismo tiempo, las hCT-MSc aumentaron la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en su superficie celular. Estos estudios sugieren que pueden asociarse múltiples mecanismos diferentes con la modulación inmunitaria mediada por hCT-MSc (datos no mostrados).

Pureza

60 Los niveles de endotoxinas se determinarán según el POE utilizando Endosafe-PTS de Charles River con cartuchos de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) aprobados por la FDA. Este método se valida para todas las combinaciones de células/medios a ensayar. Hasta 250 μ L del producto final en Plasmalyte/5 % de HSA se diluye con agua desionizada libre de endotoxinas y se prueba según SOP. Para la liberación, los niveles de endotoxinas deben ser inferiores o iguales a 5 EU/kg de peso corporal/hora o 5 EU/mL. El tiempo anticipado para la administración del producto hCT-MSc es inferior a una hora. La dilución máxima válida y la conversión de unidades/kg/tiempo a unidades/mL se determinaron durante la validación del ensayo. El límite superior para endotoxinas se calculará usando el peso de cada sujeto antes de la liberación del producto para la infusión.

Ensayo de células maternas

5 Todos los productos de hCT-MSC seleccionados para su uso en el ensayo clínico se habrán escrito para determinar la alta resolución de HLA Clase I (ABC) y la Clase II (DR) antes de la selección final para la fabricación de P1 y P2. Esta técnica es altamente sensible para la detección de alelos HLA de terceros (maternos). Solo las unidades libres de contaminación celular materna se seleccionarán para la fabricación de P1 y P2 (WCB y producto final).

Ensayo de mutación P53

10 El ensayo de la presencia de la mutación P53 se realizará en todos los lotes de cultivos P2 seleccionados para su uso en el ensayo clínico por el laboratorio de diagnóstico Molecular clínico de la Universidad de Duke. El ADN genómico extraído de preparaciones celulares se usa para la amplificación por PCR de los exones 4 a 11 TP53. Los amplicones de ADN purificados se secuencian luego usando cebadores universales M13 hacia adelante e inversos y el Kit de secuenciación del ciclo Big Dye Terminator. Los productos se purifican con el Kit de purificación Big Dye X Terminator y se resuelven usando el analizador genético ABI 3130xl. Los datos se analizan utilizando el software ABI Data Collection, software de análisis de secuenciación y software SeqScape.

Potencia

20 La potencia puede determinarse mediante ensayos de expresión en desarrollo *in vitro*, con los resultados informados como pruebas informativas. Como se recomienda en la Guía de la FDA para Industria: Pruebas de potencia para productos de terapia celular y génica (enero de 2011), el desarrollo de un ensayo de potencia ha comenzado en desarrollo preclínico y continuará a lo largo de las fases clínicas con el objetivo de obtener un ensayo de potencia validado o una matriz de ensayo antes de presentar una BLA. Se medirá un amplio intervalo de atributos del producto además de los requeridos para la liberación, mientras que el mecanismo de acción se estudia y las actividades biológicas relevantes del producto se caracterizan. A medida que las prácticas de fabricación evolucionan los ensayos de potencia candidatos se volverán a evaluar y calificarán según corresponda.

Viabilidad

30 La viabilidad se determina mediante el uso del Nexcelem Cellometer Auto 2000 como por SOP. Se requiere un mínimo de 70 % de viabilidad del producto hCT-MSC para su liberación.

Número de Células/ Dosis

35 Hubo tres cohortes de dosificación en este estudio. El estudio incluyó doce sujetos. La primera cohorte de tres pacientes recibió una dosis única. Si no hay problemas de seguridad, la segunda cohorte de tres pacientes recibió dos dosis, a dos meses de diferencia. La tercera cohorte consistió en seis pacientes, cada uno de los cuales recibió tres infusiones de hCT-MSC con un intervalo de dos meses entre dosis. Los sujetos se dosificaron con 2×10^8 hCT-MSC/kg basándose en el recuento posterior a la descongelación. El recuento total de células en el día de la infusión se determinó mediante el recuento de células automatizado mediante el uso del Cellometer Auto 2000. El recuento celular después de descongelar se usó para calcular la dosis para la formulación final como se describió anteriormente. Cualquier célula en exceso de las requeridas para la prueba de liberación y la formulación final pueden usarse para pruebas informativas para el desarrollo de un ensayo de potencia.

Criterios de evaluación de seguridad

50 Se observó a los pacientes durante cada infusión y se monitorizó para las reacciones de infusión durante 24 horas después de cada infusión. Se identificaron eventos adversos (EA) adicionales mediante entrevistas telefónicas con los padres/tutores de los pacientes entre 7 y 10 días, 2 meses y 4 meses después de cada infusión, y 6 meses y 12 meses después de la última infusión con hCT-MSC, así como en persona en las visitas clínicas iniciales y de los 6 meses. Para el análisis, los términos de EA textuales se asignaron a la terminología estándar definida por los Criterios terminológicos comunes para eventos adversos (CTCAE) versión 4.0 y se resumieron según la gravedad y la relación con la intervención a juicio del investigador.

Evaluaciones clínicas

60 Se utilizaron múltiples evaluaciones para determinar tanto la viabilidad de la administración como la utilidad como criterio de valoración para futuros ensayos clínicos de fase II y III. Las evaluaciones iniciales se realizaron para confirmar el diagnóstico de TEA, en base a la lista de comprobaciones de DSM-5, que fue informada por el programa de observación de autismo, Segunda edición (ADOS-2) y la Versión de Diagnóstico de Autismo-Revisado (ADI-R) - Versión acortada. Se completaron evaluaciones de diagnóstico por personal de investigación clínica certificado como fiable de investigación en la administración del ADOS-2 y ADI-R. Se realizaron evaluaciones adicionales para establecer una línea base para cada paciente y para determinar la utilidad como criterio de valoración para futuros ensayos clínicos de fase II y III. Estas incluyeron las Escalas de Behor Adaptativas de Vineland-III (VABS-III), Escala

de Impresión Global Clínica (CGI), Inventor de comportamiento de desarrollo de desarrollo de riesgos instantáneos (PDDBI), Escalas de Intelligence (Scale de Mullen de Aprendizaje Temprano, Edición AGS y escalas de capacidad Diferencial, Segunda Edición (DAS-II). Otras evaluaciones de uso común son la Prueba 4 de vocabulario expresivo de imágenes de una palabra (EOWPVT-4), puntuación, puntuación PDDBI y la puntuación CGI-I.

5 **The Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Shortened Version** (Rutter M, y col. ADI-R. Torrence, CA: Western Psychological Services; 2008) es una entrevista integral para padres que evalúa el funcionamiento temprano en tres dominios: lenguaje/comunicación, interacciones sociales recíprocas y comportamientos e intereses restringidos, repetitivos y estereotipados. El entrevistador confiable de la investigación sigue procedimientos estandarizados para obtener información y registrar respuestas. Las preguntas de la entrevista incluyen varias áreas de contenido, incluidos los antecedentes del paciente, comportamientos, desarrollo temprano e hitos, adquisición del lenguaje, funcionamiento comunicativo actual, desarrollo social y juego, intereses y comportamientos, y cualquier otro comportamiento clínicamente relevante. La versión acortada de ADI-R sigue los mismos protocolos que el ADI-R estándar, pero se omiten algunas de las preguntas no necesarias para obtener una puntuación. La versión acortada ADI-R toma entre 90-150 minutos dependiendo de la edad del niño y la complejidad de los comportamientos. La ADI-R se completó durante el proceso de selección de cada paciente y se utilizó para ayudar a informar un diagnóstico de TEA según el DSM-5.

20 **The Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition (ADOS-2)** (Lord C, y col. Autism Diagnostic Observation System. Los Angeles, CA: Western Psychological Services; 1999) es una evaluación observacional estandarizada de la sintomatología central del TEA. Los módulos que dependen de la edad y el lenguaje se componen de una serie de actividades dirigidas por un médico capacitado y confiable en investigaciones para observar la comunicación, las interacciones sociales, el juego y los comportamientos restringidos y repetitivos del niño. Los protocolos ADOS-2 están diseñados para provocar comportamientos que se corresponden directamente con los criterios del TEA DSM-5. El ADOS-2 se puede administrar a niños pequeños de hasta 12 meses de edad. La edad y la capacidad verbal se utilizan para determinar el módulo apropiado (niño pequeño, 1, 2, 3 o 4). Para cada evaluación del módulo para niños pequeños ADOS-2, se generará una puntuación utilizando las puntuaciones de gravedad calibradas del módulo para niños pequeños desarrolladas por Esler y col. (2015) para facilitar la comparación con otros módulos. También se generarán puntuaciones de gravedad para los módulos 1-4. El ADOS-2 toma aproximadamente 45-60 minutos para administrarse. Esta evaluación se usó para ayudar a informar a un diagnóstico de DSM-5 de TEA, y se completó en la visita inicial para cada paciente.

35 La Lista de verificación del Manual estadístico de diagnóstico-5 (DSM-5) es una lista de verificación médica basada en los criterios de diagnóstico para el TEA dentro del Manual estadístico y de diagnóstico de trastornos mentales-5. Se toman criterios de diagnóstico del DSM-5, y se utilizan para confirmar el diagnóstico de TEA apropiado para su inclusión en el estudio. Esta lista de verificación fue completada por médicos capacitados utilizando su mejor criterio y se basó en la información recopilada durante la administración de ADI-R, versión abreviada y ADOS-2. El DSM-5 se completó en la visita inicial para cada paciente.

40 **The Mullen Scales of Early Learning, AGS Edition** (Mullen EM, Western Psychological Services; 1995) es una evaluación del funcionamiento cognitivo diseñada específicamente para niños muy pequeños y preescolares, desde el nacimiento hasta los 68 meses. Mide cinco escalas de funciones cognitivas: Motricidad gruesa, recepción visual, motricidad fina, lenguaje expresivo y lenguaje receptivo (nota: para este estudio, no se administrará la subescala de motricidad gruesa). Cada escala se prueba individualmente y el examen no es cronometrado. Algunas de las preguntas pueden requerir la opinión de los padres para evaluar la capacidad del niño. El examen es interactivo e incluye juguetes y manipuladores para que el niño participe durante el examen. El tiempo de administración del ensayo varía de aproximadamente 15 minutos para un año de edad a una hora para 5 años de edad. El Mullen se usó con pacientes en 4 años, 0 meses en la visita inicial, y se llevó a cabo solo en la visita inicial.

50 **The Differential Ability Scales, Second Edition (DAS-II)** (Elliott CG. Differential Ability Scales, 2nd ed. San Antonio, Tx: Harcourt Assessment; 2007) es una evaluación administrada por un médico capacitado para observar el comportamiento y calcular una puntuación para evaluar las capacidades cognitivas. Esta prueba es apropiada durante edades de 2 años, 6 meses a 17 años, 11 meses y se usará para pacientes de 4 años, 0 meses y mayores al inicio del estudio. Esta evaluación dura aproximadamente 45 minutos y se llevó a cabo en la visita inicial.

55 **The Vineland Adaptive Behavior Scales-III (VABS-III)** (Sparrow S, y col. Vineland Adaptive Behavior Scales: Interview Edition. Circle Pines, MN: American Guidance Service; 1984) es un cuestionario para cuidadores que se utiliza para evaluar el comportamiento adaptativo de los niños en una amplia gama de dominios. El VABS-III es una medida bien estandarizada con una fuerte fiabilidad y validez (Ballii G, y col. J Autism Dev Disord 2016; 46:42-52; Perry A, y col. J Autism Dev Disord 2009; 39:1066-1078; Yang S, y col. J Autism Dev Disord 2016; 46:64-73; Sparrow S, y col. Vineland Survey Forms Manual. 2a ed. Minneapolis, MN; NCS Pearson Inc; 2005) lo que produce una puntuación compuesta general, así como puntuaciones estándar de subescala en los siguientes dominios: Socialización, Comunicación, Habilidades de la vida diaria y Habilidades motoras. La VABS-III se recopiló del cuidador principal de cada paciente en las visitas iniciales y a los 6 meses. La puntuación de la subescala de socialización se utilizó para medir las mejoras en el síntoma central del comportamiento social del TEA.

65

Interacción entre padres e hijos (PCI) con Noldus EthoVision: Durante la tarea de interacción entre padres e hijos, se utilizará Noldus EthoVision. El propósito del seguimiento de vídeo es determinar si el seguimiento automatizado de los movimientos de niños relacionados con la estrategia social o evitación puede administrarse de manera fiable y proporcionar una medida válida de comunicación social en niños con TEA. Este paradigma está diseñado para rastrear automáticamente los movimientos relacionados con el enfoque social y el comportamiento de evitación de niños con TEA con un adulto familiar. La variable dependiente primaria es el tiempo que pasa en la periferia de una habitación frente a cerca del adulto. El participante se observará durante dos sesiones contiguas realizadas en la misma habitación que comprende (1) una sesión de juego libre de seis minutos con juguetes disponibles durante el cual el cuidador se sentará silencioso en la esquina de la habitación y (2) una interacción padre-hijo de seis minutos, donde el padre se une al niño para el juego interactivo para ver cómo el niño juega con el adulto y viceversa. Se grabará el comportamiento desde una cámara montada en el techo y el software se usará para rastrear automáticamente los movimientos del niño. Las variables dependientes incluyen el porcentaje de sesión gastada en la región de interés (ROI) del cuidador, latencia para acercarse a la ROI del cuidador, y el porcentaje de tiempo dedicado en la ROI periférica. El tarea de interacción de los niños-niños se realizará con las visitas iniciales, 6 y 12 meses.

La Impresión Clínica Global (CGI) es una escala de calificación comúnmente usada que mide la gravedad de los síntomas y la respuesta del tratamiento o cambio en el comportamiento entre los momentos. Se usaron dos versiones de la CGI CGI-gravedad (CGI-S) y mejora de CGI (CGI-I). La CGI-S es una escala de 7 puntos que indica la gravedad de los síntomas de cada paciente de TEA en el momento de la evaluación, en relación con la experiencia pasada de la persona experta con pacientes que tienen el mismo diagnóstico. En base a la experiencia clínica de vida útil de la persona experta y toda la información disponible, cada paciente se calificó como 1: no presente (sin TEA), 2: síntomas TEA apenas evidentes, 3: síntomas de TEA leves, 4: síntomas de TEA moderados, 5: síntomas de TEA moderadamente graves, 6: síntomas de TEA graves o 7: síntomas de TEA muy graves. A cada paciente se le asignó una calificación CGI-S en las visitas iniciales y de 6 meses. El CGI-I es una escala de 7 puntos que indica el grado de mejora o empeoramiento de los síntomas de TEA con respecto al valor de referencia. Basado en toda la información disponible, cada paciente se calificó como 1: mejoró muchísimo, 2: mejoró mucho, 3: mejoró mínimamente, 4: sin cambio, 5: mínimamente peor, 6: mucho peor, o 7: muchísimo peor. A cada paciente se le asignó una calificación CGI-I en la visita de 6 meses, y cada una referenció el grado de mejora o empeoramiento con respecto a la calificación de CGI-S inicial. Todas las calificaciones CGI-S y CGI-I se realizaron por médicos altamente experimentados con experiencia en TEA.

Entrevista de CGI: La entrevista al cuidador CGI la completa un médico y se lleva a cabo con el cuidador principal. La entrevista se centra en las capacidades y los desafíos de las comunicaciones sociales del participante, los intereses restringidos, los comportamientos repetitivos y el funcionamiento general. El médico obtendrá detalles sobre la frecuencia y la calidad de los comportamientos en diferentes contextos, como en el hogar, en la escuela y en la comunidad, así como los detalles sobre el nivel de soporte que el niño requiere funcionar en cada configuración. La entrevista se completará en la visita inicial y se actualice en las visitas de 6 y 12 meses. La entrevista tarda aproximadamente 45 minutos en completarse en la visita inicial y tardará aproximadamente 30 minutos a completar las visitas de 6 y 12 meses. Esta información se usa para hacer la calificación CGI-I y CGI-S.

The Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory (PDDBI) (Cohen IL, y col. J Autism Dev Disord. 33(1):31-45 (2003)) es un cuestionario para cuidadores que está diseñado para evaluar la capacidad de respuesta a la intervención en niños con TEA. El PDDBI es una escala de calificación basada en informante que está diseñada para niños de 1 año, 6 meses a 12 años, 5 meses. Evalúa comportamientos problemáticos, así como habilidades sociales, de lenguaje y aprendizaje/memoria apropiados. El PDDBI evalúa tanto las deficiencias sociales típicamente asociadas con el subtipo activo pero extraño de TEA como el desarrollo de habilidades prosociales que son integrales para mejorar el comportamiento social recíproco. El PDDBI genera puntuaciones brutas y puntuaciones t basadas en comparaciones con una población estandarizada de cuidadores y maestros de niños con TEA de diversos orígenes raciales, étnicos y socioeconómicos. (Cohen IL, Sudhalter V. PDD Behavioral Inventory Professional Manual. Lutz, FL: Psychological Assessment Resources Inc; 2005). El PDDBI se recogió del cuidador primario de cada paciente en las visitas iniciales y de 6 meses.

The Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4 (EOWPVT-4) (Martin NA, Brownell R. EOWPVT-4. 4ª ed. Novator, CA: Academic Therapy Publication Inc; 2011) es una evaluación administrada por el médico que mide la capacidad de un individuo para hacer coincidir una palabra hablada con una imagen de un objeto, acción o concepto. Pone a prueba la capacidad de un individuo para nombrar, con una palabra, objetos, acciones y conceptos cuando se les presentan ilustraciones en color. Este ensayo es apropiado durante edades de 2-80 años y tarda aproximadamente 10-30 minutos en completarse; el tiempo de finalización se determina por la capacidad verbal de un individuo. Esta evaluación se realiza en las visitas inicial, de 6 y de 12 meses.

Información acerca del número de horas que los pacientes estaban implicados en terapias del comportamiento, del lenguaje hablado, ocupacional y otras terapias conductuales y los servicios educativos al niño recibidos no se incluyeron dentro de este estudio, pero se pueden incluir a través de las Entrevistas de historial de intervención estructurada con el progenitor.

Cuestionarios para padres y cuidadores

Todos los cuestionarios para cuidadores se completan en línea a través de un sistema EDC aprobado por Duke o en papel. La herramienta de encuesta EDC está disponible para los usuarios de Duke a través de una licencia del sitio para toda la universidad. La EDC se integra con el sistema de autenticación NetID de Duke, pero permite compartir las exploraciones con usuarios sin Duke.

Inventario de conducta del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI). El PDDBI se desarrolló para evaluar la capacidad de respuesta a la intervención en niños con TEA. El PDDBI es una escala de calificación basada en informante que está diseñada para niños de 1 año, 6 meses hasta 12 años, 5 meses. Evalúa conductas problemáticas, así como habilidades sociales, lingüísticas y de aprendizaje/memoria apropiadas. El PDDBI evalúa tanto las deficiencias sociales típicamente asociadas con el subtipo activo pero extraño de TEA como el desarrollo de habilidades prosociales que son integrales para mejorar el comportamiento social recíproco. El PDDBI genera puntuaciones brutas y puntuaciones t basadas en comparaciones con una población con TEA estandarizada. El PDDBI ha sido validado en una muestra de desarrollo de PDDBI de 311 niños entre las edades de 1 y 17 años de edad. Este es un cuestionario principal con 188 elementos que tarda aproximadamente 30-45 minutos para completarse. El PDDBI se administra en las visitas de referencia, 6 y 12 meses y de forma remota a los 3 y 9 meses.

Lista de verificación de comportamiento aberrante-Comunidad (ABC-C). Esta escala de calificación completada por los padres se utiliza para medir conductas aberrantes asociadas con el TEA, con énfasis en aislamiento social. La ABC-C es una escala validada que puede evaluar los efectos de medicamentos y otros tratamientos en estudios con personas con discapacidades del desarrollo. Análisis de factores separados de datos de muestras de participantes en institucionados ($n = 418$ [edad media 29,5 años] en la etapa 1 y $n = 509$ [edad media 25,9 años] en la etapa 2) dio como resultado una escala de 5 factores que comprende 58 elementos. Los factores fueron etiquetados como (1) Irritabilidad, Agitación, Llanto; (2) Aislamiento Social; (3) Comportamiento Estereotipado; (4) Hiperactividad, Incumplimiento; y (5) discurso inapropiado. El ABC-SQW se ha usado en otros ensayos clínicos que se enfocan en el núcleo social y los síntomas de comunicación del autismo. El ABC-C tiene 58 ítems, y cada ítem se califica como 0 = no es un problema en absoluto, 1 = el comportamiento es un problema, pero leve en grado, 2 = el problema es moderadamente grave o 3 = el problema es severo en grado. Esta escala de calificación global completada tarda aproximadamente de 10 a 15 minutos para completarse. La ABC-C se completa en las visitas de referencia, 6 y 12 meses y de forma remota a los 3 y 9 meses.

Cuestionario de historial de intervención. Este cuestionario se completa por un cuidador primario para obtener información detallada sobre intervenciones de salud conductual en que el niño/familia ha estado involucrado en los últimos 3 meses o dado que el cuestionario se había administrado por última vez. La información se recoge sobre el tipo y la cantidad de intervenciones, servicios y tratamientos al niño. Este cuestionario se administra mensualmente.

Inventario de calificación de conducta de la función ejecutiva-Versión preescolar (BRIEF-P). Esta evaluación es un cuestionario para los padres de niños de edad preescolar que permiten a los profesionales evaluar comportamientos de función ejecutiva en los entornos domésticos y preescolares. Está diseñado para una amplia gama de niños en edad preescolar, incluidos aquellos con discapacidades emergentes de aprendizaje y trastornos de atención, trastornos del lenguaje, lesiones cerebrales traumáticas, exposición al plomo, trastornos generalizados del desarrollo y otras afecciones neurológicas, psiquiátricas y médicas del desarrollo. El BRIEF-P contiene 63 elementos y tarda aproximadamente 15 minutos en completarse. El BRIEF-P se utiliza con participantes menores de 5 años al inicio del estudio. Este cuestionario se completa en las visitas inicial, de 6 y de 12 meses.

Inventario de Calificación del Comportamiento de la Función Ejecutiva (BRIEF). Esta evaluación es un cuestionario para padres de niños de la edad escolar que permiten a los profesionales evaluar comportamientos de función ejecutiva en los entornos domésticos y escolares. El formulario para padres del BRIEF contiene 86 elementos dentro de ocho escalas clínicas derivadas teórica y empíricamente que miden diferentes aspectos del funcionamiento ejecutivo: Inhibir, Cambiar, Control Emocional, Iniciar, Memoria de Trabajo, Planificar/Organizar, Organización de Materiales y Monitorear. El BRIEF toma aproximadamente 15 minutos para completarse y se usará con participantes de 5 años y mayores al inicio del estudio. Este cuestionario se completa en las visitas inicial, de 6 y de 12 meses.

Cuestionario de experiencias sensoriales, versión 2.1 (SEQ 2.1). El SEQ 2.1 solicita a los padres que respondan, en una escala Likert de 5 puntos, a 45 preguntas sobre la frecuencia de respuestas de sus niños a estímulos sensoriales en el contexto de actividades diarias y rutinas. Este estudio usará una versión modificada que solo pregunta a los padres para completar las preguntas de escala de Likert y omite todas las preguntas abiertas. El SEQ 2,1 ha sido validado para niños con autismo 2 -12 años, ha demostrado discriminar niños con TEA del retardo de desarrollo y típicamente desarrollar controles, y tiene una alta consistencia interna ($\alpha = 0,80$). Las puntuaciones resumidas se derivan de la hiperreactividad (SOR). El SEQ 2.1 toma aproximadamente 10 minutos para completarse y solo se completa en la visita inicial.

Herramienta de evaluación de exposiciones en la vida temprana (ELEAT). Este es un cuestionario principal que evalúa una multitud de exposiciones ambientales que los padres/niño pueden haber sido expuestos a la vida temprana y desarrollo del niño. El cuestionario exige una variedad de preguntas sobre la vida antes del embarazo, durante el embarazo y durante el primer año de vida del niño, y proporciona un aspecto cuantitativo muy detallado en cualquier

posible exposición alimentaria o química que pueda haber sido perjudicial. Para el estudio se usa una versión modificada y acortada del ELEAT que solo incluye variables relevantes. Esta evaluación tarda aproximadamente 10 minutos en completarse y solo se completa en la visita inicial.

5 **Escalas de síntomas gastrointestinales del Inventario de calidad de vida pediátrica (PedsQL).** La Escala de síntomas gastrointestinales de PedsQL es un cuestionario para padres de 10 minutos que mide los síntomas gastrointestinales en niños, ya que más del 50 % de los niños con TEA sufren molestias gastrointestinales. Esta evaluación se completa en las visitas iniciales, 6 y 12 meses.

10 **Centro para la forma demográfica del autismo y desarrollo cerebral (CABD).** La forma de datos demográficos CABD recoge la raza y la etnicidad según las normas de informes de NIH. Preguntas adicionales recopilan datos para ayudar a caracterizar la población. Este cuestionario de origen tarda menos de 5 minutos en completarse y solo se completa en la visita inicial.

15 Neurofisiología y diagnóstico por imágenes

Electroencefalografía (EEG): La EEG es una medida no invasiva de la actividad cerebral. Una matriz densa flexible de electrodos (EGI System 400, Electrical Geodesics Inc., Eugene, Oregon) se coloca sobre la cabeza y se asegura con un barboquejo. Las señales de EEG se amplifican y se envían para registrar el ordenador para la visualización en línea. El EEG se usa aquí para investigar patrones de actividad cerebral provocados por estímulos sociales y no sociales. El EEG tarda aproximadamente 20 minutos y se completa en las visitas de referencia, 6 y 12 meses.

20 El EEG se usa para evaluar los cambios en la activación cortical (como se refleja por los cambios en los ritmos alfa, theta y beta) y la conectividad funcional (como se refleja por los cambios en la coherencia de EEG) durante una condición de referencia y mientras se ven estímulos sociales y no sociales. Se ha demostrado que las alfa oscilaciones emergen de las activaciones de la red talamho-cortical y también se han demostrado que están presentes en áreas subcorticales, incluida la región del hipocampo. Las frecuencias alfa resultan de una interacción recíproca entre las neuronas excitatorias e inhibitoras y están influenciadas por mecanismos colinérgicos, serotoninérgicos y glutamatérgico. La actividad alfa aumenta durante un estado relajado y disminuye durante el procesamiento activo de estímulos. Las oscilaciones theta son especialmente prominentes en la región del hipocampo, están influenciadas por la interacción entre las neuronas glutamatérgicas y gamma-animobutírico (GABAérgicas) y pueden correlacionarse con la plasticidad sináptica.

25 El EEG se registra durante un estado de referencia en reposo y mientras se ven segmentos grabados en vídeo estandarizados de estímulos sociales (una mujer cantando una canción infantil) y no sociales (juguetes activados). En un estudio de niños en edad preescolar con TEA, se ha demostrado que la potencia alfa y theta EEG durante la visualización de estímulos sociales y no sociales cambia en función del tratamiento conductual y se correlaciona específicamente con mejoras en el comportamiento social. Un ensayo de etiqueta abierta de fase I realizado en Duke evaluando la seguridad y eficacia de la sangre de cordón umbilical autólogo para el tratamiento del autismo demostró normalización del espectro de EEG reflejado en aumentos en la potencia alfa después del tratamiento. Los datos de EEG se registran a partir de redes de sensores geodésicos de matriz de electrodos densos de 128 canales (grabados en línea con referencia al vértice) a 500 Hz, filtrados de paso alto a 0,1 Hz y filtrados de paso bajo a 200 Hz. EEG se edita tanto a través del software automático de detección de artefactos (Net Station 4.4) como de la edición manual sin conocimiento de la pertenencia al grupo.

35 **Análisis espectrales.** Los datos de EEG se transforman con Fourier utilizando el método de Welch (implementado en Matlab, R2012b). Las estimaciones de potencia se promediarán a través de los grupos de electrodos (derecha posterior y anterior, izquierda posterior y anterior, electrodos occipital de la línea media) y se transforman en registro natural para reducir el sesgo. En un ensayo de etiqueta abierta anterior que evalúa la eficacia de la sangre de cordón umbilical autólogo para mejorar los síntomas del autismo, también se encontraron cambios significativos en las características espectrales de EEG después de la infusión, que se caracterizaron por un aumento de la potencia alfa y beta y disminuyó la potencia de EEG theta. Además, la mayor potencia beta posterior del EEG de referencia se asoció con un mayor grado de mejora en los síntomas de comunicación social, destacando el potencial de un biomarcador EEG para predecir la variación en el resultado.

40 **Seguimiento ocular (EGT).** El EGT es una evaluación técnica de 15 minutos mediante el uso de equipos especializados en un entorno controlado para rastrear la atención visual a través de los movimientos oculares de los niños con autismo. Se ha descubierto que los niños con TEA asisten a estímulos sociales menores que los niños típicamente en desarrollo. Un ensayo de etiqueta abierta de fase I realizado en Duke evaluando la eficacia de la sangre de cordón umbilical autólogo para tratar el autismo demostró aumentos en la atención a estímulos sociales que se correlacionaron con aumentos en las capacidades sociales, informados en el VABS. Esta evaluación es apropiada para niños de 1 año a adultos. A los niños se les muestran cintas de vídeo de escenas que involucran estímulos sociales y no sociales. Las variables dependientes incluyen cuánto tiempo pasa el niño mirando los estímulos sociales versus no sociales en las cintas de vídeo, incluidos los aspectos específicos de los estímulos sociales que atraen y mantienen la atención del niño. El EGT se realiza en las visitas de referencia, 6 y 12 meses.

Análisis de visión por ordenador (CVA). La evaluación CVA consta de una serie de estímulos dinámicos breves diseñados para provocar síntomas de autismo, incluidas respuestas de atención, afecto facial y respuestas motoras. El análisis de visión por ordenador se usa para codificar automáticamente estos comportamientos. Los estudios muestran que CVA puede cuantificar de manera objetiva, confiable y sensible los síntomas del autismo. El CVA se realiza en las visitas de referencia, 6 y 12 meses.

Neuroimágenes. Las IRM se usan para evaluar posibles modificaciones estructurales/anatómicas, y cambios funcionales, en el cerebro antes y después de la terapia celular. Las imágenes de IRM se utilizan para correlacionar el hierro del cerebro con los síntomas de TEA. Los cambios en las imágenes de resonancia magnética pueden reflejar alteraciones en la actividad de los astrocitos, la perfusión sanguínea, la integridad del tracto de fibras, la integridad de la red cerebral, la integridad microestructural de la mielina y la conectividad funcional del cerebro. En un ensayo de etiqueta abierta que evalúa la eficacia de la sangre de cordón umbilical autólogo para tratar los síntomas del autismo, la mejora en 3 medidas de resultados conductuales se correlacionó con una mayor conectividad entre el polo temporal izquierdo y el hipocampo izquierdo (VABS II $p < 0,001$; EOWPVT-4 $p < 0,05$; CGI-I $p < 0,0001$). La mejora tanto en el VABS II como en el EOWPVT-4 se correlacionó con una mayor conectividad entre la fusiforme y el putamen (VABS II $p < 0,05$; EOWPVT-4 $p = 0,01$) así como entre el giro temporal inferior y el hipocampo (ambos $p < 0,05$), ambos en el hemisferio izquierdo. Finalmente, hubo una correlación significativa entre la mejora tanto en el VABS II como en el CGI-I y el aumento de la conectividad entre el giro temporal inferior y el giro temporal superior (VABS II $p < 0,05$, CGI-I $p < 0,01$) y entre el polo temporal y el globus pallidus $p < 0,01$; CGI-I $p < 0,05$) en el hemisferio izquierdo. La mejora en el VABS II y el CGI-I también se correlacionó significativamente con una mayor conectividad entre el polo frontal y el globus pallidus y la insula y putamen en el hemisferio derecho (todo $p < 0,05$).

Se realizan estudios usando un escáner de IRM de GE Premier Performance 3T, que es una versión mejorada del sistema Premier aprobado por la FDA de GE, pero con mejores capacidades para la formación de imágenes de alta resolución. Todos los parámetros operativos en este sistema mejorado están dentro de las directrices de la FDA para cumplir con los mismos criterios de dispositivo de riesgo mínimo y asegurar la seguridad de los sujetos humanos. Como tal, no es necesario una conclusión de dispositivo en investigación (IDE). La investigación realizada bajo este protocolo no debe evaluar la seguridad y eficacia de este dispositivo.

Se puede utilizar la siguiente obtención de imágenes;

- Imágenes de T1 de alta resolución T1, FSPGR de IR previamente preparado en 3D, resolución de 1 x 1 x 1 mm, tiempo de formación de imágenes estimado 3 minutos.
- Imágenes de perfusión de alta resolución, espiral 3D con etiquetado de espines arteriales, resolución objetivo 1,5 x 1,5 x 1,5 mm (evaluarán 1 x 1 x 1 SNR proporcionada es suficiente), tiempo de formación de imágenes estimado 3 minutos.
- Imágenes del tensor de difusión de alta resolución, secuencia base de EPI de múltiples disparos 2D, 25 direcciones de codificación por difusión, b factor 800 s/mm², resolución objetivo 1,5. x 1,5 x 1,5 mm (evaluará 1 x 1 x 1 SNR proporcionada es suficiente), tiempo de formación de imágenes estimado 10 minutos.
- fMRI de alta resolución, secuencia de bases EPI 2D de uno o dos disparos, resolución de diana 1,5x1,5x1,5 mm (evaluará 1x1x1 siempre que la SNR sea suficiente), tiempo estimado de obtención de imágenes de 10 minutos. (5 minutos por corrida, dos ciclos).
- Imágenes de susceptibilidad cuantitativa de alta resolución, adquisición basada en FSPGR 3D de múltiples ecos, resolución diana 1 x 1 x 1 mm, tiempo de formación de imágenes estimado 5 minutos.

Poblaciones de análisis

Población de análisis completo. Todos los participantes inscritos en el ensayo.

Población de seguridad. Todos los participantes que recibieron al menos una administración del producto de estudio. El análisis de los criterios de valoración de seguridad se realizará en esta población.

Población modificada por tratamiento (mITT). Todos los participantes para quienes se observó el resultado primario al inicio del estudio y el mes 6. Los criterios de valoración primarios y secundarios se analizarán en esta población. Los participantes se analizarán según el tratamiento asignado. Si no faltan datos, esta población será equivalente a la población de análisis completo. Sin embargo, en el caso de que haya diferencias sustanciales entre las poblaciones de análisis mITT y Completa, se considerará una ponderación de probabilidad inversa u otros enfoques apropiados para el escenario de datos que faltan.

Informes de eventos seguros y adversos

Evento adverso (EA): Un evento adverso es cualquier evento médico desagradable asociado con el uso del producto en investigación independientemente de si se considera relacionado con el producto en investigación.

5 Evento Adverso Grave (EAG): Un evento adverso o una reacción adversa sospechosa se considera “grave” si, en vista del investigador o patrocinador, resulta en cualquiera de los siguientes brotes de: muerte, un evento adverso potencialmente mortal, hospitalización de paciente o prolongación de hospitalización existente, una incapacidad persistente o significativa o alteración sustancial de la capacidad de realizar funciones normales de vida, o una anomalía congénita/defecto de nacimiento. Los eventos médicos importantes que pueden no dar como resultado la muerte, ser potencialmente mortales, o requerir hospitalización pueden considerarse graves cuando, basándose en un juicio médico apropiado, pueden poner en peligro al paciente o sujeto y pueden requerir intervención médica o quirúrgica para prevenir uno de los resultados enumerados en esta definición.

Grado/ Severidad: El grado/ gravedad se evaluará según las directrices CTCAE v5.0.

15 Reacción adversa sospechosa: Una reacción adversa sospechosa es cualquier evento adverso para el que existe una posibilidad razonable de que el producto en investigación causó el evento adverso. “Actividad reparable” significa que hay evidencia de sugerir una relación causal entre el producto en investigación y el evento adverso.

20 Causalidad: El investigador usará la siguiente pregunta al evaluar la causalidad de un evento adverso al producto en investigación: “¿Hay una posibilidad razonable de que el producto en investigación causó el evento?” Una respuesta afirmativa designa el evento como una reacción adversa sospechosa.

Informes de eventos adversos

25 Todos los eventos adversos informados u observados durante el estudio que comienza en el momento de la infusión de hCT-MSC deben registrarse. Los EA que ocurren en el 5 % de los participantes inscritos se informarán en clinicaltrials.gov. La información que se debe informar incluye cuándo el sitio tuvo conocimiento del evento, la evaluación especificada por el investigador sobre la gravedad y la relación con la terapia del estudio, si existe una etiología alternativa, la gravedad, así como cualquier tratamiento o evaluación requerido y el resultado. En general, los investigadores deben informar de eventos adversos como enfermedades o síndromes siempre que sea posible, en lugar de informar síntomas individuales de componentes, signos, anomalías de laboratorio y secuelas.

35 Se notificarán reacciones de infusión adversas graves (mortal, potencialmente mortal o que requiera hospitalización) dentro de siete días de calendario de recepción de la información. Todos los EAGs fatales o potencialmente mortales serán notificados por el investigador o sus representantes a la FDA por teléfono o fax dentro de siete días de calendario después de recibir la información, siguiendo las directrices de la FDA. Todos los EA graves e inesperados se informarán a la FDA mediante un informe escrito dentro de 15 días de recepción de la información (21-CFR-312,32). Si el investigador principal evalúa un evento para no estar relacionado con el estudio, entonces el evento no requerirá una notificación acelerada sino que se incluirá en el informe de resumen anual.

40 Los siguientes eventos dentro de las 24 horas de la infusión de hCT-MSC también se registrarán en el e-CRF: reacción alérgica/hipersensibilidad, bradicardia sinusal, taquicardia sinusal, hipertensión, hipotensión, fiebre, rigurosos/escalofríos, náuseas, vómitos, infección, disnea, hipoxia y hemoglobinuria.

45 Informe de eventos adversos graves

50 El Investigador Principal o su representante será responsable del informe de teléfono o fax de cualquier EAG inesperada a la FDA. El Investigador Principal o su representante notificarán a la FDA por teléfono o fax de cualquier experiencia mortal o de amenaza mortal (informe acelerado) asociado con el uso de la terapia del estudio tan pronto como sea posible pero no más tarde que siete días de calendario después de recibir la información. La notificación inicial será seguida por un informe escrito dentro de 15 días de calendario. Para los EAG asociados con el uso de la terapia del estudio, el Investigador Principal notificará a la FDA tan pronto como sea posible, pero no más tarde a 15 días, de la recepción inicial de la información. El Investigador Principal o SubInvestigador es responsable de informar la Junta de Revisión Institucional (IRB) y DSMB de cualquier EAG relacionado e inesperado en el estudio.

55 Instrucciones de Detención

60 Las siguientes pautas de detención se controlarán durante la duración del estudio. Las pautas de detención serán monitorizadas por el equipo del estudio y deben usarse para indicar límites que requieren una discusión por los investigadores y DSMB. El estudio se detendrá para una revisión de seguridad si:

- Cualquier sujeto experimenta reacciones de infusión de grado 4-5 dentro de 48 horas de infusión; O
- Ocurren dos o más eventos adversos de grado 4-5 que el monitor de seguridad médica y/o el DSMB determinan que están relacionados temporalmente con el producto del estudio; O

- Cualquier sujeto experimenta una infección del torrente sanguíneo dentro de los 6 meses de infusión; O
- Cualquier sujeto desarrolla EICH de grado II-IV; O
- 5 • Cualquier muerte.

Ejemplo 1: Las infusiones de hCT-MSK son seguras y factibles en niños pequeños con trastorno del espectro autista

Diseño y descripción del estudio

Se realizó un ensayo abierto de fase I, de un solo centro, de una, dos o tres infusiones intravenosas de células estromales mesenquimales derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hCT-MSK), administradas cada dos meses, en 12 niños con TEA. Inicialmente, todos los niños fueron inscritos en un protocolo de detección para obtener registros médicos. Todos los cuidadores de los pacientes completaron una entrevista de detección previa al estudio por teléfono y proporcionaron registros médicos y videos para su revisión por el equipo del estudio para determinar la elegibilidad para el ensayo. Los niños de dos (2) a once años de edad (11) con un diagnóstico confirmado de TEA fueron elegibles para participar. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito tanto para la detección como para las fases de tratamiento del ensayo. El ensayo fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Duke Hospital realizada bajo el registro IND#17313.

Los pacientes (n = 12) y sus cuidadores viajaron a la Universidad de Duke entre dos y cuatro veces, dependiendo del número de infusiones de hCT-MSK administradas, como parte de su participación en el estudio. En su visita inicial, cada paciente se evaluó y recibió una única infusión intravenosa de hCT-MSK. La primera cohorte de tres pacientes recibió una dosis única. Una segunda cohorte de tres pacientes recibió dos dosis, administradas dos meses. Una tercera cohorte de seis pacientes recibió tres dosis, cada una administrada dos meses. A los seis (6) meses después de la visita inicial y la infusión inicial de hCT-MSK, los pacientes regresaron para las evaluaciones clínicas de seguimiento (ver Figura 1 para el esquema de estudio). Se recopilaron entrevistas y encuestas adicionales a los cuidadores a los 7-10 días, 2 meses y 4 meses después de cada infusión, y a los 6 meses y 12 meses después de la última infusión de hCT-MSK para cada paciente.

Pacientes

Pacientes entre 2 y 11 años de edad que cumplieron con criterios para un diagnóstico clínico de TEA basado en el diagnóstico y Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª Ed. (DSM-5) (DSM-5. American Psychiatric Association 2013; Washington, D.C) fueron elegibles para su inclusión en el estudio. Se inscribieron doce niños, tres hembras y nueve varones, con una edad media de 6,4 años (intervalo 4-9 años). Once sujetos eran blancos, uno era asiático; dos eran hispanos o latinos. Se administraron un total de 27 dosis de hCT-MSK de 3 lotes diferentes. La dosis diana en cada administración fue de $2,0 \times 10^6$ TNC/kg (TNC = número de células nucleadas totales). La media de la dosis real infundida fue de $2,0 \times 10^6$ TNC/kg con una desviación estándar de $0,4 \times 10^6$ TNC/kg. Un paciente recibió una dosis baja de $1,79 \times 10^6$ TNC/kg (Paciente 12 en la infusión 3). El diagnóstico de TEA del DSM-5 fue establecido por médicos expertos y fundamentado por el Autism Diagnostic Observation Schedule, 2ª Ed. (ADOS-2) (Lord C, y col. ADOS-2. Torrance, CA: Western Psychological Services 2012) y el Autism Diagnostic interview, Revised (ADI-R) (Rutter M, y col. ADI-R. Torrance, CA: Western Psychological Services 2008). Criterios de inclusión adicionales incluyeron (1) el paciente se mantuvo estable con sus medicamentos actuales durante al menos 2 meses antes de la infusión, (2) Prueba de X frágil realizada y negativa, (3) recuento absoluto de linfocitos normal ($\geq 1500/\mu\text{L}$), (4) capacidad de viajar a la Universidad de Duke hasta cuatro veces (momento inicial, cada dos meses para las infusiones posteriores y 6 meses después de la infusión inicial), (5) el paciente y los padres hablaban inglés y (6) el consentimiento de los padres. Los criterios de exclusión incluyeron (1) antecedentes de terapia celular previa, uso de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) u otros medicamentos antiinflamatorios (con la excepción de AINE), o terapia inmunosupresora actual o previa, (2) genética conocida (p. ej., frágil X) síndrome u otra comorbilidad médica significativa, (4) infección activa o no controlada conocida, como una infección del SNC o VIH positivo, (5) trastorno médico conocido, como, entre otros, un trastorno metabólico, disfunción mitocondrial, trastorno convulsivo no controlado, neoplasia maligna activa o neoplasia maligna previa tratada con quimioterapia, trastorno de inmunodeficiencia primaria, citopenias autoinmunes, dismorfología física obvia que sugiere un síndrome genético, insuficiencia renal o hepática, deterioro sensorial o motor significativo y (6) diagnóstico conocido de Condiciones psiquiátricas coexistentes, que incluyen depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo y síndrome de Tourette.

Justificación del estudio

La justificación mecanicista para este estudio clínico plantea la hipótesis de que hCT-MSK puede actuar a través de mecanismos paracrin y alocrin para modular la inflamación continua y/o la patología inmunitaria en el cerebro y posiblemente proteger a las neuronas del daño adicional. En muchos contextos, las MSC amortiguan, en lugar de aumentar, las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Mecanismos documentados incluyen cambios en las células T efectoras tales como la generación de poblaciones reguladoras de células T y cambios en la generación de citocinas de monocitos/células dendríticas que conducen a citocinas antiinflamatorias. Un régimen de dosificación múltiple puede mejorar la tasa total y la duración de la respuesta.

Se ha demostrado que las MSC ejercen efectos inmunomoduladores (ver, Vellasamy y col., *Cytotherapy* 2016; 18(10):1270-1283; Gesundheit, y col., *Med Hypotheses* 2015; 84(3):169-177; Koh y col., *J Neurosci* 2015; 35(47):15649-15665; (Jaimes y col., *Stem Cells* 2016; doi:10.1002/stem.2541; and Ooi y col., *Neuroimmunomodulation* 2015; 22(4):233-242). No está claro si estos fenómenos son causados por un efecto directo de las MSC o están mediados por otro mecanismo. La investigación en la Universidad de Duke demostró que las hCT-
 5 MSC producen y secretan múltiples citocinas y quimiocinas mediante el uso de matrices de citocinas por RayBiotech (Norcross, GA). Usando ensayos Bioplex y ELISA, se muestran los niveles medidos de citocinas/quimiocinas seleccionadas en la Tabla 4.

10

Tabla 4. Producción de citocinas y quimiocinas por hCT-MSc.

Citocina/quimiocina	Intervalo de sobrenadante P2, pg/mL
BioPlex	
IL-6	178 - 1134
CCL2 /MCP-1	270 - 453
CXCL1/GROD□	250- 1280
CXCL5	880 - 3025
CXCL8/IL-8	250 - 837
ELISA	
Trombospondina-1	150 - 415
Un Bioplex ha validado muchos de los hallazgos de las matrices de citocinas.	
Se han usado ensayos ELISA para cuantificar la producción de trombospondina-1 y -2.	

30 Procedimientos: infusión de hCT-MSc

Como se discutió anteriormente, el producto final se obtuvo a partir de los cultivos P2 que se cosecharon en plasmalyte (Baxter Healthcare, Deerfield, IL) con albúmina de suero humano al 5 % (HSA) (Grifols, Barcelona, España), lavados y criopreservados en criobolsas de 5 compartimentos (Syngen) en 5 mL que contienen 50-100 millones de células en una concentración final de 10 % de DMSO con dextrano (Akron Scientific, Boca Raton, FL). El día de la administración, se descongeló un compartimento, se diluyó en 10-40 mL de solución de plasmalyte IV, se colocó en una jeringa o bolsa y se transportó al lado de la cama para administración durante 30-60 minutos.

35

Se seleccionaron tres lotes de hCT-MSc para este ensayo clínico. Cada lote se probó en 1-2 pacientes en cada nivel de dosis, por Tabla 5. Un total de 12 pacientes se trataron con 3 regímenes de dosificación. Para pacientes que recibieron dosis múltiples, cada dosis consistió en 2×10^6 Las hCT-MSc/kg y las dosis recibieron dos meses de diferencia.

40

Tabla 5: Dosificación del paciente y lote de células hCT-MSc dado.

	# del paciente	# de dosis	# de Lote de hCT-MS
Cohorte 1	1	1	1 (GMP-047)
	2	1	2 (GMP-051)
	3	1	3 (GMP-058)
Cohorte 2	4	2	1 (GMP-047)
	5	2	2 (GMP-051)
	6	2	3 (GMP-058)
Cohorte 3	7	3	1 (GMP-047)
	8	3	1 (GMP-047)
	9	3	2 (GMP-051)
	10	3	2 (GMP-051)
	11	3	3 (GMP-058)
	12	3	3 (GMP-058)

Todos los sujetos recibieron al menos una infusión de células hCT-MSC alogénicas. El día de la infusión, las células hCT-MSC fueron descongeladas y preparadas por el laboratorio CT2 GMP según el procedimiento operativo estándar y se proporcionaron para la infusión del paciente en la clínica bajo la supervisión del equipo de estudio y el personal del Programa de trasplante de médula y sangre pediátrica. Se obtuvieron signos vitales iniciales (frecuencia cardíaca, presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria). La oximetría de pulso se controló continuamente durante la infusión y durante al menos 5 minutos después de la infusión. Se colocó un periférico IV por personal clínico, anestesia o un miembro del equipo de estudio. Después de la medicación previa con Benadil (0,5 mg/kg IV) y Solumedrol (0,5 mg/kg IV), los pacientes recibieron hCT-MSC a una dosis de 2×10^6 células/kg de peso corporal, infundidas durante 30-60 minutos. Se observó a los pacientes en la clínica durante un mínimo de 1 hora después de la infusión. Los pacientes fueron dados de alta de la clínica después de al menos 1 hora una vez que todos los signos vitales estuvieron en los niveles iniciales y los pacientes estaban asintomáticos sin evidencia de toxicidad. Los pacientes fueron evaluados por el personal del estudio el día después (en 24 horas de) la infusión para evaluar las reacciones adversas relacionadas con la infusión o las complicaciones. Se realizó una llamada telefónica a padres/guardianes por personal del estudio para evaluar la seguridad de la infusión 7-10 días después de la infusión.

Seguridad de las infusiones de hCT-MSC

El criterio de valoración principal de este ensayo abierto de fase I fue de seguridad. Los resultados muestran que las infusiones de hCT-MSC fueron bien toleradas. Se incluyeron (12) pacientes en el estudio para recibir una, dos o tres infusiones de hCT-MSC. Todos los 12 pacientes completaron su (s) infusión (s) hCT-MSC. La evaluación de los eventos adversos a través del período de infusión y 12 meses después de la infusión final indicó que el tratamiento fue seguro y bien tolerado. Los eventos adversos fueron leves, esperados, y no relacionados con el producto de estudio. No se informaron eventos adversos graves. Más específicamente, se informaron tres reacciones en 2 pacientes en 24 horas de infusión. Un paciente en la Cohorte 2 experimentó alergia y hipotensión moderada después de la infusión 2. Debido a una reacción adversa de agitación extrema a Benadil IV durante la infusión inicial, este paciente recibió Atarax oral como premedicación alternativa para la segunda infusión. Poco después del inicio de la segunda infusión de hCT-MSC, la eritromia difusa desarrollada por el paciente y una tos seguida de hipotensión leve e hipoxia. La infusión se detuvo inmediatamente y el paciente se recuperó completamente con un bolo líquido y una dosis adicional de IV Solumel. El resto de la infusión de hCT-MSC se completó con éxito después de una dosis de Benadil IV. Un paciente en la cohorte 3 experimentó hipotensión moderada después de la infusión 3 y recibió fluidos IV adicionales.

Se informó un total de 53 eventos adversos no graves (EA) (53 Leve y 1 moderado) entre el 11 de 12 pacientes inscritos (Figura 2). El evento que se produce más frecuentemente fue la agitación (13 eventos, o 26 % de los eventos informados totales) seguido de otros síntomas psiquiátricos (7 eventos, o 13 % de todos los eventos informados). La agitación contabiliza un tercer evento en la Cohorte 1, 1/2 de eventos en la Cohorte 2 y ~1/5 de eventos en la Cohorte 3. La mayoría de los informes de agitación fueron después de la 1ra infusión (8 eventos) seguido de la 2a infusión (4 eventos) e 3ª infusión (1 evento). Todos los eventos de agitación se informaron el mismo día que la infusión y también se resolvieron el mismo día. Los 8 otros síntomas psiquiátricos se informaron en 5 sujetos: 1 sujeto/1 evento en la Cohorte 1 y 4 sujetos/7 eventos en la Cohorte 3. Se produjeron seis de los síntomas psiquiátricos después de la primera infusión y se produjeron 2 eventos después de la 3ª infusión. El tiempo medio hasta el inicio de los síntomas psiquiátricos después de la infusión fue de 20 días (de = 15,2; Intervalo: 2-44 días). Seis meses después de la dosis inicial de hCT-MSC, se observó el desarrollo de anticuerpos HLA en 5 participantes que no tenían anticuerpos de HLA detectables antes del tratamiento (datos no mostrados). Estas se continúan monitoreando y no han sido clínicamente significativas.

Prueba de comportamiento

También se probó la viabilidad de la administración y se describieron los resultados de varias medidas típicamente usadas para evaluar los resultados del comportamiento en niños con TEA. Se evaluaron múltiples medidas parentales-nominales y con clasificación clínica. El análisis de los primeros 10 pacientes mostró que 6 de 10 pacientes se calificaron como que muestran una mejora en la Escala de Impresión Clínica Global (CGI) y 7 de 10 pacientes mostraron mejoras en la socialización o subescalas de comunicación de las escalas de comportamiento adaptativo de Beheand (VAB). Se observaron mejoras significativas en el comportamiento de los pacientes en las medidas de habilidades de comunicación social informadas por los padres (Escala de comportamiento adaptativo de Vineland) para los pacientes cuyo coeficiente intelectual no verbal era más alto al inicio del estudio.

Los resultados de las evaluaciones de resultados conductuales se muestran en la Tabla 6. Las medidas que se informan a continuación incluyen evaluaciones de habilidades de comunicaciones sociales (VABS) con aumentos de 3 puntos y anteriores que indican la mejora, gravedad de los síntomas del autismo (PDD-BI) con disminuciones indicativas de la mejora, y juicio clínico experto (CGI) que varía de ninguna mejora, a mucha mejora. Cincuenta y ocho por ciento (7/12) de los pacientes mostró una mejora en al menos 2/3 de las medidas, 42 % (5/12) mostró una mejora en las tres medidas, y 16 % (2/12) mostró una mejora en 2/3 de las medidas. De los ocho niños que mejoraron en 2/3 de las medidas de resultados, dos tenían una dosis, dos tenían dos dosis, y tres tenían tres dosis.

Tabla 6: Evaluaciones de comportamiento, estudio de fase I de hCT-MSD en niños con TEA

ID	Dosis	Sexo	IQ	VABS*	PDDBI	CGI	# de evaluaciones que indican mejoría
1	1	M	62	-2	-	Min	1
2	1	M	68	4	6	Min	2
3	1	M	45	22	-22	Min	3
4	2	F	59	0	-6	Gran parte	2
5	2	M	40	-10	-1	No	0
6	2	M	36	8	-22	Min	3
7	3	M	42	-2	0	No	0
8	3	M	54	-8	-4	No	1
9	3	M	71	-3	6	Min	1
10	3	M	82	19	-20	Min	3
11	3	F	59	4	-7	Min	3
12	3	F	95	7	-2	Min	3

VABS = Escala de comportamiento adaptativo de Vineland, tercera edición (VABS-III), Puntuación estándar de socialización, PDDBI = Inventario de comportamiento del trastorno generalizado del desarrollo, Compuesto de autismo, CGI = Escala de mejora de impresión clínica global
*Mejora clínicamente significativa = 3 puntos.

Discusión

En este estudio abierto de fase I, se evaluó la seguridad y viabilidad de una, dos y tres infusiones intravenosas de hCT-MSD en niños jóvenes con TEA. También se describieron cambios en diversas medidas de resultados funcionales y de comportamiento para determinar cuáles serían las más adecuadas para su uso como criterios de valoración en futuros ensayos de terapia celular. Las evaluaciones de los eventos adversos durante los 12 meses posteriores a la infusión indicaron que las infusiones de hCT-MSD fueron seguras y bien toleradas. Todos los eventos relacionados se consideraron esperados, no relacionados con las hCT-MSD (producto del estudio) y se resolvieron sin secuelas.

Ejemplo 2. Estudio de fase II: Eficacia y seguridad de dosis intravenosas únicas y repetidas de hCT-MSD en niños con TEA.

Este estudio es un ensayo de fase II, prospectivo, aleatorizado diseñado para evaluar la eficacia de la dosificación intravenosa de hCT-MSD en niños jóvenes con TEA. Niños con edades de cuatro a ocho años con TEA son elegibles para participar. Todos los sujetos se tratan con hCT-MSD. Los sujetos aleatorizados al grupo A reciben dos dosis intravenosas de 2×10^6 hCT-MSD por kilogramo, una al inicio del estudio y una a tres meses, seguido de una infusión de placebo ciego a los seis meses. Los sujetos aleatorizados al grupo B reciben dos infusiones de placebo, una al inicio del estudio y uno a tres meses, seguido de una dosis intravenosa de 2×10^6 hCT-MSD por kilogramo a los seis meses (ver Figura 3A). Todos los participantes tienen una evaluación clínica inicial para verificar el diagnóstico de TEA y confirmar la elegibilidad del protocolo. El criterio de valoración principal es el cambio en las habilidades de comunicación social (un síntoma central del autismo) desde el inicio hasta seis meses después de la infusión inicial de hCT-MSD

según lo medido por el formulario de entrevista de la encuesta de la Escala de comportamiento adaptativo de Vineland (VABS) -3, puntuación estándar de la subescala de socialización. Los criterios de valoración secundarios clave incluirán la puntuación estándar de subescala de comunicación VABS-3, la puntuación compuesta de PDD-BI, la Escala de Impresión Clínica Global y la gravedad y mejora, y la puntuación cruda de prueba de Vocabulario de una sola Palabra Expresiva. Los análisis exploratorios comparan la medida del resultado primario en este estudio con el mismo resultado observado en una cohorte de niños similares con TEA que participan en un estudio longitudinal del historial natural de TEA realizado en el Instituto Nacional de Salud Mental (NIMH). Las medidas de resultado específicas de TEA adicionales, descritas a continuación, se evalúan al inicio, seis y 12 meses. Se recogen y describen evaluaciones de seguridad que incluyen reacciones de infusión agudas, incidencia de infecciones y marcadores de aloinmunización. La duración de la participación en el estudio es de 12 meses desde el momento de la primera infusión de hCT-MSD.

Objetivos del estudio

Objetivo primario: Determinar la eficacia de hCT-MSK para mejorar las habilidades de comunicación social en niños con TEA.

5 **Objetivo secundario:** Describir la gravedad de los síntomas del autismo, la mejora global evaluada por el médico y los cambios en la capacidad del lenguaje después del tratamiento con hCT-MSK.

10 **Objetivos exploratorios:** (1) Describir diferencias en las habilidades de comunicación social entre sujetos tratados con hCT-MSK en este estudio con niños con TEA de un intervalo de edad similar observado en un estudio longitudinal del historial natural de TEA patrocinado por NIMH. (2) Describir cambios en comportamientos adaptativos y habilidades motoras después del tratamiento con hCT-TEA. (3) Describir cambios en IRM, EEG, medidas de atención ocular y análisis de visión por ordenador de los síntomas del autismo después del tratamiento con hCT-MSK.

Diseño del estudio

15 Diseño general

Este es un estudio prospectivo, aleatorizado, de fase II, de un solo sitio, de infusión intravenosa de hCT-MSK en 60 niños de 4 a 8 años con TEA. Todos los sujetos se tratan con hCT-MSK con un esquema de aleatorización 1:1 que prueba diferentes esquemas de dosificación (ver Figura 3A y Figura 3B). El criterio de valoración principal es el cambio en las habilidades de comunicación social (un síntoma central del autismo) desde el valor de referencia hasta seis meses después de la infusión inicial de hCT-MSK, medida por Formulario de Entrevista de Encuesta de la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland (VABS)-3, Puntuación Estándar de Subescala de Socializaciones. La duración de la participación en el estudio es de 12 meses desde el momento de la primera infusión de hCT-MSK.

25 Criterios de valoración del estudio

Criterio de valoración principal: El criterio de valoración principal de este estudio es el cambio en las habilidades de socialización (un síntoma central del autismo) desde el valor de referencia hasta seis meses después de la infusión inicial de hCT-MSK, medida por la Puntuación Estándar de Socialización VABS-3. Grupos A&B (exposición total de 6×10^9 / kg en una dosis única) se comparan con Grupos C&D (exposición total de 6×10^9 / kg en 3 dosis igualmente divididas). Grupos A&C y B&D se comparan con el grupo de control de Placebo externo del ensayo de DukeACT.

Criterios de valoración secundarios: El cambio medido en los siguientes criterios de valoración desde el valor de referencia hasta seis meses se compara entre Grupos A&B, C&D, y el grupo de Placebo de DukeACT.

- 35
1. Puntuación Estándar de Comunicación VABS-3.
 2. CGI-S y CGI-I.

40

 3. Prueba de Vocabulario de Imagen de una Palabra Expresiva

Criterios de valoración exploratorios: El cambio medido desde el valor de referencia hasta doce meses se evalúa en las siguientes medidas de resultados. Los grupos A, B, C y D se comparan entre sí y al grupo de Placebo del ensayo de DukeACT.

- 45
1. Puntuación Estándar de Socialización VABS-3.
 2. Puntuación Estándar de Comunicación VABS-3.

50

 3. Compuesto de Comportamiento Adaptativo VABS-3 y puntuaciones de subescalas de Habilidades de la vida diaria, Comunicación y Habilidades motoras.
 4. Medidas de IRM.

55

 5. Medidas de EEG.
 6. Atención evaluada mediante seguimiento ocular.
 7. Síntomas de autismo evaluados mediante análisis de visión por ordenador (CVA).

60 **Criterios de valoración de seguridad:** La seguridad de la infusión de hCT-MSK en niños con TEA se evalúa mediante:

- 65
1. Incidencia y gravedad de reacciones a la infusión.
 2. Incidencia y gravedad de infecciones relacionadas con el producto.

3. Evidencia de aloinmunización a través de anticuerpos anti-HLA y anti-RBC y marcadores no específicos de inflamación sistémica (ESR, CRP).

5 4. Incidencia y gravedad de enfermedad injerto vs. huésped.

5. Incidencia y gravedad de acontecimientos adversos inesperados, en relación con el producto de estudio.

Selección y aislamiento de participantes en investigación

10 Población de estudio

Sesenta niños de 4-8 años con un diagnóstico confirmado de TEA.

15 Criterios de inclusión

1. Edad ≥ 4 años a ≤ 9 años (8 años, 364 días) en el momento del consentimiento.

20 2. Diagnóstico clínico DSM-5 confirmado del trastorno del espectro autista usando el DSM-5. Lista de verificación según lo informado por la Escala de Observación de Diagnóstico de Autismo - 2.

3. Prueba Fragil X realizada y negativa; Se realizó CMA y/o secuenciación completa del exoma y los resultados no están relacionados con el diagnóstico de autismo.

25 4. Estable en el régimen de medicación psiquiátrica actual (dosis y programa de dosificación) durante al menos 2 meses antes de la infusión del producto de estudio.

5. Recuento absoluto de linfocitos ($\geq 1500/\mu\text{L}$).

30 6. Participante y padre/guardián están hablando en inglés.

7. Capaz de viajar a la Universidad de Duke tres veces (valor de referencia, tres meses, seis meses) y el padre/tutor puede participar en encuestas y entrevistas provisionales.

35 8. Consentimiento paterno.

Criterios de exclusión

40 1. **General:**

a. La revisión de los registros médicos indica que no es probable que se diagnostique TEA.

45 b. Diagnóstico conocido de cualquiera de las siguientes condiciones psiquiátricas coexistentes: depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo asociado con trastorno bipolar, síndrome de Tourette.

c. Los datos de detección sugieren que el participante no sería capaz de cumplir con los requisitos de los procedimientos del estudio según lo evaluado por el equipo del estudio.

50 d. Familia está ausente o no es posible comenzar a participar en todas las evaluaciones relacionadas con el estudio, incluido el seguimiento del protocolo.

e. Un hermano está inscrito en este estudio (Duke hCT-MSD).

55 2. Genética:

a. Los registros indican que el niño tiene un síndrome genético conocido tal como (pero no limitado a) síndrome de Fragil X, neurofibromatosis, síndrome de Rett, esclerosis tuberosa, mutación de PTEN, fibrosis quística, distrofia muscular o un defecto genético que se sabe definitivamente que están asociados con TEA.

60 b. Mutación patógena conocida o variación en el número de copias (CNV) asociada con TEA (por ejemplo, 16p11.2, 15q13.2, 2q13.3).

3. Infeccioso:

65 a. Infección de SNC activa conocida.

- b. Evidencia de infección descontrolada basada en registros o evaluación clínica.
- c. Positividad para VIH conocida.
- 5 4. Médicos:
 - a. Trastorno metabólico conocido.
 - b. Disfunción mitocondrial conocida.
- 10 c. Historial de epilepsia inestable o trastorno de convulsiones no controladas, espasmos infantiles, síndrome de Lennox Gastaut, síndrome de Dravet u otro trastorno de convulsiones crónicas similares.
- d. neoplasia maligna activa o malignidad previa que se trató con quimioterapia
- 15 e. Historial de un trastorno de inmunodeficiencia primaria.
- f. Historial de citopenias autoinmunitarias (es decir, ITP, AIHA).
- g. condición médica coexistente que coloque al niño en un mayor riesgo de complicaciones por los procedimientos del estudio.
- 20 h. Enfermedad genética o adquirida concurrente o comorbilidad(es) que podrían requerir un trasplante futuro de células madre.
- 25 i. Deterioro sensorial significativo (p. ej., ceguera, sordera, discapacidad auditiva no corregida) o motora (p. ej., parálisis cerebral).
- j. Función renal o hepática alterada según lo determinado por la creatinina sérica >1,5 mg/dL o bilirrubina total >1, 3 mg/dL, excepto en pacientes con enfermedad de Gilbert conocida.
- 30 k. Anomalías hematológicas significativas definidas como: Hemoglobina < 10,0 g/dL, WBC < 3.000 células/mL, ALC < 1000/uL, Plaquetas < 150 × 10⁹/uL.
- l. Evidencia de dismorfología física clínicamente relevante indicativa de un síndrome genético según la evaluación de los PIs u otros investigadores, incluidos un genetista médico y psiquiatras capacitados en identificar características dismórficas asociadas con condiciones del desarrollo neurológico.
- 35 5. Terapia actual/ anterior:
 - a. Disponibilidad de una unidad de sangre de cordón umbilical autóloga calificada y almacenada.
 - b. Historial de terapia celular anterior.
 - c. Uso actual o anterior de IVIG u otros medicamentos antiinflamatorios con la excepción de los AINE.
 - 45 d. Terapia inmunosupresora actual o anterior;
 - i. Sin tratamiento con esteroides sistémicos que haya durado > 2 semanas y sin esteroides sistémicos en los 3 meses anteriores a la inscripción. Se permiten los esteroides tópicos e inhalados.
- 50 Aislamiento temprano de los participantes en la investigación
- Criterios de eliminación de la terapia de protocolo: (a) Diagnóstico de una enfermedad genética mientras está en evaluación o en estudio. (b) Cambio en el estado médico que impide la participación en el estudio.
- 55 Los pacientes que están fuera de la terapia de protocolo deben seguirse hasta que cumplan con los criterios del estudio (ver más abajo). Los datos de seguimiento se obtendrán en los participantes fuera del protocolo a menos que se retire el consentimiento. Los sujetos que sean retirados del estudio antes de la infusión de hCT-MSC se considerarán no evaluables y pueden ser reemplazados por otro sujeto.
- 60 Criterios de retirada del estudio:
 - 1. Muerte.
 - 65 2. Pérdida de seguimiento.

3. Aislamiento del consentimiento para cualquier colección adicional de datos.
4. Finalización de la visita final del estudio.

5 Células estromales mesenquimales derivadas del tejido del cordón umbilical humano (hCT-MSc)

Las hCT-MSc son un producto de células alogénicas fabricadas a partir de tejido del cordón umbilical digerido que se expande en cultivo, se criopreserva y se almacena. Las hCT-MSc se fabrican a partir de tejido del cordón umbilical donado al Carolinas Cord Blood Bank, un banco público de sangre de cordón umbilical acreditado por FACT y con licencia de la FDA en el Centro Médico de la Universidad de Duke, después del consentimiento informado por escrito de la madre del bebé. El tejido del cordón umbilical se extrae de las placentas de bebés varones nacidos por cesárea electiva después de un embarazo normal a término. Los cuestionarios de detección de donantes se completan por el donante materno, y la sangre materna se prueba para enfermedades comunicables mediante el laboratorio de detección de donantes certificado por CLIA en la Cruz Roja Americana en Charlotte, NC. Los donantes deben ser elegibles para la donación a un banco de sangre de cordón umbilical público para uso alogénico. Después de la expulsión de la placenta y el cordón umbilical, la sangre del cordón umbilical se drena asépticamente de la placenta. Luego, el cordón se seca y se limpia con cloropreps, se separa de la base de la placenta, se coloca en un frasco estéril que contiene Plasmalyte A y se transporta al laboratorio de procesamiento de células Robertson CT2 GMP a temperatura ambiente en un recipiente validado.

En el conjunto de fabricación de sala limpia, en una cabina de bioseguridad, el tejido del cordón umbilical se retira del medio, se coloca en platos estériles, se corta en piezas pequeñas y luego se trocea y se digiere en el Miltenyi Biotec GentleMacs Octo Dissociator con enzimas de grado GMP: hialuronidasa, DNasa, colagenasa, papaína. La suspensión celular resultante se coloca en cultivo en medios de expansión XFSM (Irvine Scientific) Primario XV MSC con lisado plaquetario al 1 % y se cultiva hasta confluencia (- 7-14 días) para establecer el cultivo P0. Para establecer el banco de células maestro, P0 se recoge y se criopreserva en crioviales con medio Cryostor 10 (BioLife) y se almacena en la fase de vapor del nitrógeno líquido. Los cultivos P1 y P2 se cultivan en condiciones similares, en hipermatrices o hiperpilas sin lisado plaquetario, según sea necesario para crear el banco de células de trabajo y el producto para la administración, respectivamente. Las células de P1 y P2 se retiran del material de cultivo plástico usando TrypLE (Gibco). El producto final se deriva de los cultivos P2 que se recogen en plasmalyte con albúmina sérica humana al 5 %, se lavan y se criopreservan en criobolsas de 5 compartimentos (Syngen) en 5 mL que contienen 50-100 millones de células en una concentración final de DMSO al 10 % con dextrano (Akron Scientific). El día de la administración, se descongela un compartimento, se diluye en 10-40 mL de solución de plasmalyte IV, se coloca en una jeringa o bolsa y se transporta a la lateral de la cama para administración durante 30-60 minutos.

En cada pasaje, el producto celular se caracteriza por evaluar el fenotipo de la superficie celular mediante citometría de flujo y ensayos funcionales mediante la proliferación de células T y modelos organotípicos de la activación microglial. Cada lote, antes de la criopreservación de P2, también se ensayará para determinar la esterilidad, endotoxina y micoplasma y estas pruebas deben cumplir con las especificaciones. Para la dosificación, las pruebas de liberación después de descongelar y diluir incluirán TNCC y viabilidad a través de celometer. Los cultivos de esterilidad (14 días) también se inician pero los resultados no están disponibles en el momento de la infusión. Los pacientes se dosifican con 2×10^6 hCT-MSc/kg basándose en el recuento posterior a la descongelación.

Selección y prueba de donantes

La selección y las pruebas de los donantes se realizan según los procedimientos operativos estándar del Carolinas Cord Blood Bank para cumplir con todos los requisitos de 21 CFR Parte 1271. La detección y las pruebas están actualizadas con las recomendaciones y están aprobadas por la FDA bajo el número de licencia biológica 1870. Los donantes maternos de sangre del cordón umbilical se seleccionan y prueban para VIH-1, VIH-2, virus de la hepatitis B (VHB, antígeno de superficie y núcleo), virus de la hepatitis C (VHC), Treponema pallidum (sífilis), CJD (solo detección), Chagas, virus linfotrópicos T humanos tipos 1 y 2 (HTLV-1, HTLV-2) y CMV. Las pruebas de ácido nucleico para HIV-1/2/O, VHB, WNV y VHC también se realizan en sangre materna. También se puede realizar la detección para el virus de Zika.

Proceso y formulación Final

Las hCT-MSc se fabrican a partir de un solo tejido del cordón umbilical en una serie de tres pasos que generan un banco de células maestro, un banco de células de trabajo y el producto de estudio. El producto para cada paso se congela y se almacena en fase de vapor en el congelador de nitrógeno líquido. En P2, una criobolsa representativa se descongela y califica antes del tratamiento de cualquier paciente con ese lote de producto. Los ensayos incluyen recuento celular, viabilidad, fenotipo, ensayos funcionales, endotoxina, micoplasma, tinción de gram y esterilidad.

El día del tratamiento, las células se descongelan por SOP CT2-MSc-006, se diluyen en 10-40 mL de plasmalyte-A + 5 % de HSA, y una alícuota retirada para el recuento celular, la viabilidad y el cultivo de esterilidad. Si las células cumplen con los criterios de liberación, el volumen del producto final se ajusta para suministrar la dosis adecuada (2 o 6×10^6 células/kg) al sujeto del estudio. Las células se entregan junto a la cama en una bolsa o jeringa que contiene

plasmalito A, HSA al 5 % y DMSO residual. Cualquier suspensión celular retirada se inocula en botellas de cultivo aeróbicas y anaeróbicas para pruebas de esterilidad. Las células tienen una caducidad de cuatro horas después de la descongelación.

5 El producto final hCT-MSD se libera condicionalmente para la administración al paciente después de probar un recuento y viabilidad de células después de la descongelación. La liberación final se producirá después del período de cultivo de esterilidad de 14 días para el producto de estudio. En el caso de que un cultivo de esterilidad se active después de la administración del producto, se identifica el organismo y se realizan sensibilidades antibióticas. La familia del paciente se pone en contacto para determinar si son sintomáticas (es decir, fiebre). Los pacientes
10 asintomáticos no se tratarán con antibióticos. Los pacientes sintomáticos se evalúan y tratan en consecuencia, con cultivos sanguíneos y antibióticos según sea apropiado. Todos los pacientes que reciben un producto con prueba de esterilidad positiva posterior se siguen con contacto diario por una enfermera del estudio durante 14 días después de que se indique la prueba de esterilidad positiva.

15 Producto de placebo

Las hCT-MSD crioconservadas que se han descongelado para la administración tienen un aroma distintivo debido al DMSO usado en la crioconservación. Para que los pacientes y las familias sean verdaderamente ciegos al tipo de infusión que reciben, el producto placebo debe ser similar tanto en el aspecto como en el olor. Por lo tanto, el producto
20 placebo es acelular y consiste en plasmalyte-A con DMSO al 1 % que son ingredientes estándar en productos celulares. El volumen de producto de placebo es de 10-40 ml, que es el mismo intervalo usado para el producto hCT-MSD. La solución de placebo se coloca en el mismo recipiente final, por lo que el personal clínico, los pacientes y las familias permanecen ciegos para el producto de estudio o placebo en el momento de la infusión de seis meses.

25 Administración del producto

Los pacientes se admiten en el centro de infusión el día de su infusión programada. Los pacientes pueden requerir cierta sedación antes de la colocación IV si no pueden permanecer inmóviles o cooperar. El personal clínico o del estudio coloca una vía intravenosa periférica. Los pacientes se premedican con Benadil 0,5 mg/kg/dosis IV y Solumel
30 0,5-1 mg/kg IV. Las hCT-MSD o el producto de placebo se administran por vía intravenosa durante 30-60 minutos. Los signos vitales (frecuencia cardíaca, presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria) se intentan al llegar a la clínica y se controlan según esté clínicamente indicado. La oximetría de pulso se controla continuamente durante la infusión y durante al menos 5 minutos después de la infusión. Se debe observar a los pacientes un mínimo de 15-30 minutos después de la infusión.

35 Seguimiento de seguridad

El día 1 después de cada infusión, el personal del estudio se observa para evaluar las reacciones adversas relacionadas con la infusión o las complicaciones. A los 7-10 días después de cada infusión, un miembro del equipo
40 del estudio entra en contacto con el padre o el tutor por teléfono o correo electrónico para evaluar el estado del paciente y cualquier evento adverso. Un cuestionario se administra en cada visita posterior y a los 6 y 12 meses para evaluar los eventos adversos graves. PRA se obtiene antes del tratamiento y a los 6 y 12 meses después de la dosificación de MSD.

45 Plan de estudio

Descripción general

Una vez que se completa toda la detección y es probable que el paciente cumpla los criterios de estudio, el paciente viajará a Duke para su primera visita. El día 1, se obtiene el consentimiento informado y la elegibilidad del paciente se determina mediante una observación física y la verificación del diagnóstico TEA por los criterios de DSM-5. Si el niño se considera elegible, se inscribe en estudio y se aleatoriza a una de las cohortes de dosificación de hCT-MSD. Durante su primera visita, también sufre evaluaciones clínicas y neuropsicológicas adicionales, pruebas de EEG, seguimiento ocular y evaluaciones de CVA, e IRM. Los participantes se evalúan el día después de cada infusión en
50 persona o por llamada telefónica y los padres se ponen en contacto 7-10 días después de cada infusión para seguir la evaluación de seguridad. Los participantes vuelven a Duke para las infusiones de hCT-MSD planificadas y el monitoreo, y a los seis y 12 meses después de su dosis inicial para el seguimiento clínico, neuropsicológico, EEG, el seguimiento ocular, el CVA y el seguimiento de seguridad.

60 Evaluación de pacientes

La evaluación del estudio se realiza bajo un protocolo de evaluación aprobado por IRB separado (Pro00063563). En este protocolo, después de que se obtiene el consentimiento informado por escrito de un padre/guardián, los registros médicos y psicológicos del paciente, los registros de la escuela, las fotografías, los videos conductuales y los resultados de todas las pruebas genéticas se obtienen y revisan por dos equipos. La revisión médica la lleva a cabo
65 un equipo de enfermeras pediátricas, enfermeras practicantes y médicos para identificar la presencia de cualquier

5 criterio de exclusión metabólico, inmunológico, neurológico, sensorial, genético o de laboratorio. Si no se identifican
 10 tales criterios de exclusión, la revisión psiquiátrica se lleva a cabo mediante una combinación de psicólogos,
 psiquiatras y trabajadores sociales con experiencia en el diagnóstico y tratamiento de niños con TEA. Realizan una
 15 revisión exhaustiva de los registros psicológicos del paciente, así como de los registros escolares y de terapia
 disponibles. El equipo de detección psiquiátrico llevará a cabo la evaluación ADI-R. Ambos equipos revisan las
 fotografías y los registros del paciente para evaluar las características dismórficas. Cualquier paciente con
 características faciales cuestionables o hallazgos en pruebas genéticas es revisado por un geneticista médico con
 20 experiencia en afecciones genéticas asociadas con TEA. Un paciente debe ser aprobado por equipos de detección
 médicos y psiquiátricos para proceder con un laboratorio o teléfono adicional o una evaluación en la persona y la
 inscripción del estudio. Si surge una preocupación por una afección o hallazgo genético previamente no diagnosticado
 durante el proceso de detección, esto se discutirá con el/los padre(s)/guardián(es) del paciente y se hará referencia a
 un proveedor médico o psiquiátrico apropiado para la evaluación y el tratamiento, si se indica.

15 Infusiones de estudio

20 Todos los sujetos reciben al menos una infusión de células hCT-MSC alogénicas. El día de la infusión, las células
 hCT-MSC o un producto placebo se descongelan y se preparan por el laboratorio CT2 GMP y/o Cell Stem Cell Lab
 por procedimiento de funcionamiento estándar y se proporcionan para la infusión del paciente en la clínica bajo la
 supervisión del equipo del estudio y del personal del programa de trasplante de médula dental. Se obtienen signos
 vitales iniciales (frecuencia cardíaca, presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria). Se colocará un IV periférico
 25 por personal clínico, anestesia o un miembro del equipo del estudio. Antes de la infusión, se administran los
 premedicamentos (Benadil, Solumedrol). El producto de estudio se infunde durante 30 minutos. El niño se observa en
 la clínica durante un mínimo de 15-30 minutos después de la infusión. Se intentan líquidos intravenosos (D5 ½ NS) a
 1,5 de mantenimiento. Los pacientes son dados de alta de la clínica después de al menos 1 hora, siempre que todos
 los signos vitales estén en sus valores de referencia y estén asintomáticos sin evidencia de toxicidad. Los pacientes
 se evalúan al estudiar el personal del estudio después de la infusión para evaluar cualquier reacción o complicaciones
 30 adversas relacionadas con la infusión. Una llamada telefónica a padres/guardianes por personal del estudio para
 evaluar la seguridad de la infusión se realiza 7-10 días después de la infusión.

30 Si un paciente tiene evidencia de enfermedad en el día de la infusión planificada, que incluye, pero no se limita a la
 fiebre > 38,5 °C, vómitos, diarrea o dificultad respiratoria, la infusión se pospone.

Cuidado durante eventos inesperados

35 En el caso de que un paciente desarrolle signos o síntomas de anafilaxia, incluyendo urticaria, dificultad respiratoria,
 tos, sibilancia o vómitos durante su infusión del estudio, la infusión se termina y se inicia la terapia médica apropiada.

Evaluaciones

40 **Tabla 7.** Evaluaciones médicas y de seguridad.

	Instantes [#]					
	Detección	Valor de referencia (Visita 1)	Cada dosis de hCT- MSC o placebo	7-10 días después de MSC	6 meses	12 meses
CBCD*, CMP*, HLA de paciente, X Frágil, CMA/WES	X					
Revisión de registros anteriores ±videos	X					
Historial y Físico		X	X		X	X
Muestras para almacenamiento de ADN & células mononucleares viables, extracto de ADN y mantenimiento		X				
CBCD, CMP, Coombs directo e indirecto (T&S), Detección de anticuerpos HLA (PRA), ESR, CRP, Panel de reconstitución inmunitaria, Perfil inmunológico humoral, Panel de derivación de donantes		X*	X (CBC & CMP solamente)		X	X (PRA solamente)
Evaluación neuropsicológica		X			X	X

	Instantes [#]					
	Detección	Valor de referencia (Visita 1)	Cada dosis de hCT- MSC o placebo	7-10 días después de MSC	6 meses	12 meses
IRM		X			X	
Evaluación de seguridad en persona (Día posterior a la infusión)		X	X		X	
Evaluación de seguridad - llamada telefónica/encuesta				X		
*CBCD & CMP se puede obtener en la visita inicial o dentro de los 6 meses antes del consentimiento; HLA, X Fragil, CMA/WES en cualquier momento antes de la inscripción.						
[#] Evaluaciones de seguridad y retorno deben realizarse dentro de un mes del momento indicado.						

Tabla 8. Evaluaciones diagnósticas, conductuales, neurocognitivas y neurofisiológicas.

	Medición	Tiempo [min]	Instantes [#]				
			Valor de referencia (visita)	3 mese (remoto)	6 meses (visita)	9 meses (remoto)	12 meses (visita)
Evaluación médica previa a la visita con los padres	Entrevista de diagnóstico de autismo, revisado, Versión acortada (ADI-R)	90-150	X (visita previa)				
Evaluación del médico con el niño	Observación de diagnóstico de autismo, 2ª Ed. (ADOS -2)	45-60	X		X		X
	Escalas de Mullen de Aprendizaje Temprano, Edición AGS (MSEL)	60	X				
	Escalas de capacidad diferencial, 2ª Ed. (DAS-II)	45	X				
	Interacción entre padres e hijo (búsqueda de proximidad) (PCI)	12	X		X		X
	Prueba de vocabulario expresivo con imágenes de una palabra, 4.ª ed. (EOWPVT-4)	10-30	X		X		X
Evaluaciones fisiológicas y funcionales con el niño	Ensayo electrofisiológico (EEG)	20	X		X		X
	Seguimiento de mirada ocular de estímulo Social (EGT)	10-15	X		X		X
	Análisis de visión por ordenador (CVA)	10	X		X		X
Evaluación clínica con padres	Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland, 3ª edición, Formulario de Entrevista de Encuesta (VABS-3)	60	X		X		X
Cuestionario a los Padres	Inventario de conducta y trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI)	30	X	X	X	X	X
	Historial de intervención*	15	X	X	X	X	X
	La herramienta de evaluación de exposiciones en la vida temprana (ELEAT)	10	X				
	Lista de verificación de comportamiento aberrante: comunidad	10	X	X	X	X	X
	Cuestionario de experiencias sensoriales 2.1	10	X				

	Medición	Tiempo [min]	Instantes [#]				
			Valor de referencia (visita)	3 mese (remoto)	6 meses (visita)	9 meses (remoto)	12 meses (visita)
	Inventario Breve de Calificación del Funcionamiento Ejecutivo (BRIEF) o BRIEF-Preescolar (BRIEF-P)	15	X		X		X
	PedsQL-Inventario de síntomas gastrointestinales (PedQL)	10	X		X		X
Otras Evaluaciones Clínicas	Manual estadístico de diagnóstico 5-Lista de verificación (DSM-5)	3-5	X		X		X
	Impresión clínica global: gravedad y mejora	15	X		X		X
*El historial de intervención se recogerá mensualmente.							
# Las evaluaciones deben realizarse dentro de un mes del momento indicado.							

Consideraciones estadísticas

25 Este es un sitio único, Fase II, estudio prospectivo de infusión intravenosa hCT-MSD en 60 niños de 2-7 años con TEA. Todos los sujetos se tratan con hCT-MSD. Los sujetos se asignan al azar a uno de los cuatro esquemas de dosificación mediante el uso de una asignación uniforme. La duración de la participación en el estudio es de 12 meses desde el momento de la primera infusión de hCT-MSD. Se usa un grupo de control externo para evaluar la eficacia.

30 **Duración del estudio:** Los participantes de la investigación se inscriben en el estudio durante 12 meses después de la administración de su primera dosis de hCT-MSD.

35 **Características demográficas y del valor de referencia:** Las características demográficas y del valor de referencia se resumen para todos los participantes de la investigación. Las características a examinar incluyen la edad, el sexo, la raza/etnia y el estado de comportamiento inicial.

40 **Criterio de valoración principal:** El criterio de valoración principal de este estudio es el cambio en las habilidades de comunicación social (un síntoma central del autismo) desde el valor de referencia hasta seis meses después de la infusión inicial de hCT-MSD, medida por el Formulario de Entrevista de Encuesta de la Escala de Conducta Adaptativa de Vineland (VABS) -3, Puntuación Estándar de Subescala de Socializaciones. Grupos A&B (exposición total de 6×10^6 / kg en una dosis única) se comparan con Grupos C&D (exposición total de 6×10^6 / kg en 3 dosis igualmente divididas). Los grupos A&C y B&D también se compararán con el grupo de control de Placebo externo del ensayo de DukeACT. Los análisis de los grupos A y D individualmente se incluyen en los análisis exploratorios.

45 **Tamaño de muestra y cálculos de potencia:** Lo siguiente supone que los datos de nivel de paciente de DukeACT se agrupan con los datos del presente estudio para su análisis. La evaluación de la potencia estadística supone un modelo lineal general (GLM) se ajusta para predecir la puntuación estándar de Socialización VABS-3 del mes 6 mediante el uso de la puntuación del valor de referencia, la edad, el cociente de desarrollo no verbal (NVDQ) y el indicador de estudio (DukeACT o el presente estudio) como covariables continuas. Se supuso una correlación múltiple de $R=0,85$ ($R\text{-cuadrado}=0,7291$) entre las covariables y el puntaje 6 de Mes basándose en datos ciegos del análisis provisional del estudio de DukeACT (N=119), y bajo la suposición de una variabilidad limitada entre estudios basada en criterios similares de elegibilidad en el presente estudio y DukeACT.

50 La potencia estadística se calculó suponiendo que los contrastes se derivarían de los GLM para comparar los grupos A_{npp}; B (exposición total de 6×10^6 / kg en una dosis única) y C&D (exposición total de 6×10^6 / kg en 3 dosis igualmente divididas) al grupo placebo DukeACT y entre sí. Las hipótesis estadísticas relacionadas con estos contrastes se describen en la Tabla 9 a continuación.

60 **Tabla 9.** Hipótesis estadísticas relacionadas con el estudio.

Contraste	Hipótesis Nula	
Efecto principal del tratamiento	H0:	$\mu_A - \mu_{\text{placebo}} = 0$ y
		$\mu_B - \mu_{\text{placebo}} = 0$ y
		$\mu_C - \mu_{\text{placebo}} = 0$ y

Contraste	Hipótesis Nula	
		$\mu_D - \mu_{\text{placebo}} = 0$
Dosis única vs. placebo	H0:	$\mu_A - \mu_{\text{placebo}} = 0$ y
		$\mu_B - \mu_{\text{placebo}} = 0$
Tres dosis vs. placebo	H0:	$\mu_C - \mu_{\text{placebo}} = 0$ y
		$\mu_D - \mu_{\text{placebo}} = 0$
Dosis única vs. tres dosis	H0:	$\frac{1}{2}(\mu_A + \mu_B) - \frac{1}{2}(\mu_C + \mu_D) = 0$

Se usaron tamaños de efecto estandarizados para expresar tres hipótesis alternativas probables para las cuales se calculó la potencia suponiendo una muestra de 15 pacientes en cada uno de los brazos A, B, C y D y 60 del grupo de Placebo con ACT. Los cálculos de potencia asumen un alfa de prueba de 0,0125 (dividiendo el alfa de los experimentos de ,05 entre 4 pruebas de hipótesis como se muestra en la Tabla 10 a continuación) y suponiendo las covariables continuas mencionadas anteriormente y la correlación múltiple. Todos los análisis se realizaron mediante el uso de PROC Glimmer en SAS v9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

Tabla 10. Análisis estadísticos.

HA	Cohen's ^d	Tipo de prueba ^a	Comparación	DF de prueba	Energía
Respuesta a dosis lineal		Efecto Principal	Cualquier hCT-MS vs. Placebo	4	0,991
	0,33	Contraste	1 Dosis vs. Placebo	2	0,512
	0,5	Contraste	1 Dosis vs. 3 dosis	1	0,534
	0,67	Contraste	3 Dosis vs. Placebo	2	0,997
Común		Efecto Principal	Cualquier hCT-MS vs. Placebo	4	0,963
Efecto del tratamiento	0,5	Contraste	1 Dosis vs. Placebo	2	0,920
	0	Contraste	1 Dosis vs. 3 dosis	1	0,013
	0,5	Contraste	3 Dosis vs. Placebo	2	0,920
Efecto de un solo grupo ^c		Efecto Principal	Cualquier hCT-MS vs. Placebo	4	0,914
	0	Contraste	1 Dosis vs. Placebo	2	0,013 ^b
	0,5	Contraste	1 Dosis vs. 3 dosis	1	0,916
	0,5	Contraste	3 Dosis vs. Placebo	2	0,920
Los tamaños de muestra son: 1 Dosis (N=30 [Grupo A=15, Grupo B = 15]), 3 dosis (N=30 [Grupo C=15, Grupo D=15]), Placebo (N=60) y cualquier hCT-MS (N=60 [Grupo A+B+C+D]).					
HA=hipótesis alternativa. GL=grados de libertad.					
a. El alfa en forma de prueba es 0,0125 para todas las pruebas bajo cada HA					
b. Potencia representa el error de Tipo I por comparación en este caso, ya que no hay diferencia entre los grupos que se comparan bajo la hipótesis alternativa					
c. El ejemplo muestra el efecto de tratamiento localizado en el grupo de 3 dosis, pero las mismas características de funcionamiento se aplican si el efecto de tratamiento se localiza en el grupo de 1 dosis					

La tabla muestra que un total de 120 participantes (30 en cada uno de los Grupos A&B y C&D, y 60 de DukeACT) proporciona al menos 90 % de potencia para la detección de un efecto de tratamiento común moderado de hCT-MS o un efecto de tratamiento de solo un único régimen de dosificación de hCT-MS con control estricto del error de tipo I y ajuste de covariables. El estudio tiene menos potencia para detectar una respuesta de dosis lineal de tamaño pequeño a moderado. Específicamente, la potencia se reduce para distinguir entre los efectos de 1 o 3 dosis bajo esta alternativa.

Debe entenderse que las estimaciones anteriores de potencia estadística son altamente sensibles a la intensidad de asociación entre las covariables y la respuesta. La correlación por debajo de ~0,8 daría como resultado que el estudio se alimente mediante estándares convencionales.

5 La presente descripción demuestra que las infusiones intravenosas de hCT-MSK alogénicas en niños jóvenes con TEA son seguras y factibles. La descripción admite la conclusión de mejoras significativas en el comportamiento observado en los primeros seis (6) meses después de la infusión y que estas mejoras significativas se mantuvieron a los 12 meses después de la infusión. Un CI no verbal inicial más alto se asoció con un mayor grado de mejora. Esta descripción identifica las medidas de resultados que son factibles, sensibles al cambio, y el desarrollo apropiado y, por lo tanto, adecuada para su uso para probar la eficacia de la terapia con hCT-MSK para el tratamiento de niños pequeños con TEA en futuros ensayos clínicos y entornos terapéuticos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células estromales mesenquimales derivadas de tejido de cordón alogénico humano (hCT-MSK) para su uso en un método de tratamiento de un paciente que tiene o se sospecha que tiene un trastorno del espectro autista, en donde en dicho método se administra al paciente hCT-MSK en una cantidad total de $6,0 \times 10^6$ células/kg, y se administra en 2 a 3 dosis en 6 meses.
- 10 2. hCT-MSK para su uso según la reivindicación 1, en donde en dicho método las hCT-MSK se administran sistémicamente.
- 15 3. hCT-MSK para su uso según la reivindicación 2, en donde en dicho método las hCT-MSK se administran por vía intravenosa.
- 20 4. hCT-MSK para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde en dicho método el paciente tiene de 1 año a 45 años de edad.
- 25 5. hCT-MSK para su uso según la reivindicación 4, en donde en dicho método el paciente tiene de 2 años a 11 años de edad, o de 4 años a 8 años de edad.
- 30 6. hCT-MSK para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en dicho método se administra al paciente hCT-MSK a una dosis que es mayor que 90 % de CD73+ y CD90+, y/o menos de 10 % de CD45+, CD3+, o CD31+.
- 35 7. hCT-MSK para su uso en un método para evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento con hCT-MSK en un paciente que padece un trastorno del espectro del autismo, en donde en dicho método
 - (a) el paciente es sometido a una o más pruebas apropiadas para establecer puntuación del valor de referencia de comportamiento y/o biomarcador;
 - (b) al paciente se administra hCT-MSK a una cantidad total de $6,0 \times 10^6$ células/kg en 2 a 3 dosis en 6 meses; y
 - (c) el paciente es reevaluado en uno o más puntos temporales después de la administración de hCT-MSK para la misma o más pruebas conductuales y/o de biomarcadores,
 en donde en dicho método los resultados en (c) se comparan con la(s) puntuación(es) del (los) valor(es) de referencia establecida(s) en (a) para determinar la efectividad del tratamiento.
- 40 8. hCT-MSK para su uso según la reivindicación 7, en donde en dicho método las pruebas conductuales realizadas en (a) y (c) comprenden uno o más de: Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-II (VABS-II), Escalas de comportamiento adaptativo de Vineland-III (VABS-III), Escala de impresión clínica global (CGI), Inventario de comportamiento del trastorno generalizado del desarrollo (PDDBI), Prueba de vocabulario expresivo de imágenes de una palabra-4 (EOWPVT-4), Lista de verificación de conductas aberrantes, Cuestionario de experiencias sensoriales, Escala de conductas repetitivas, Escalas de inteligencia (Escala Mullen de aprendizaje temprano o Stanford-Binet), Análisis del entorno lingüístico, Inventario de síntomas gastrointestinales ATN e Índice de estrés parental.
- 45 9. hCT-MSK para su uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde en dicho método se reevalúa el paciente a los 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 10 años, 15 años, 20 años o indefinidamente después de la administración.

Figura 1

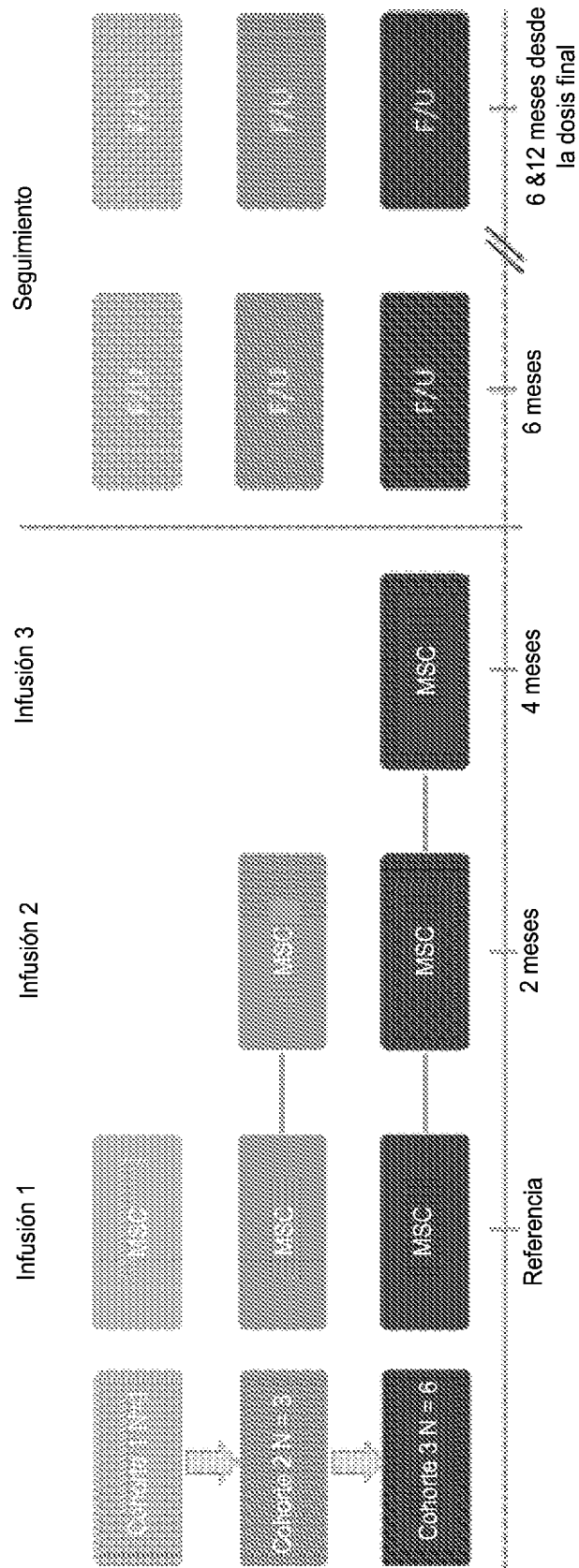


Figura 2

Frecuencia de eventos adversos no graves según relación con el producto de estudio

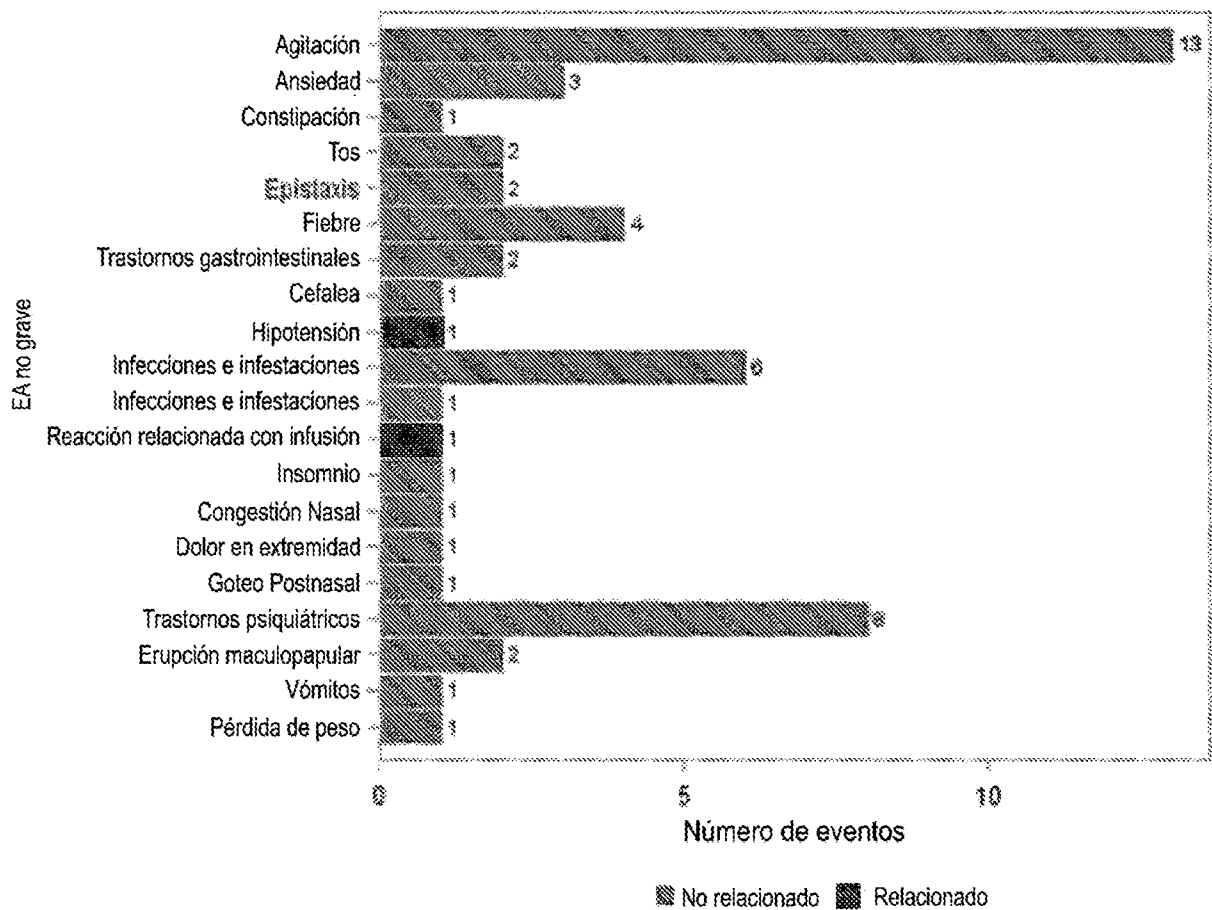


Figura 3A

Examen del paciente	Revisar registros, Labs, Videos, Fotos, ADI-R	
Inscripción	Consentimiento	
Visita de elegibilidad	Lista de comprobación ADOS, DSM-5	
Aleatorización	Grupo A	Grupo B
Infusión & Evaluaciones iniciales	2 x 10⁶/kg nCT-MSC	Placebo
Infusión de 3 meses	2 x 10⁶/kg nCT-MSC	Placebo
Infusión & Evaluaciones de 6 meses	Placebo	2 x 10⁶/kg nCT-MSC
Evaluaciones remotas de 12 meses	Medidas informadas por los padres	

Figura 3B

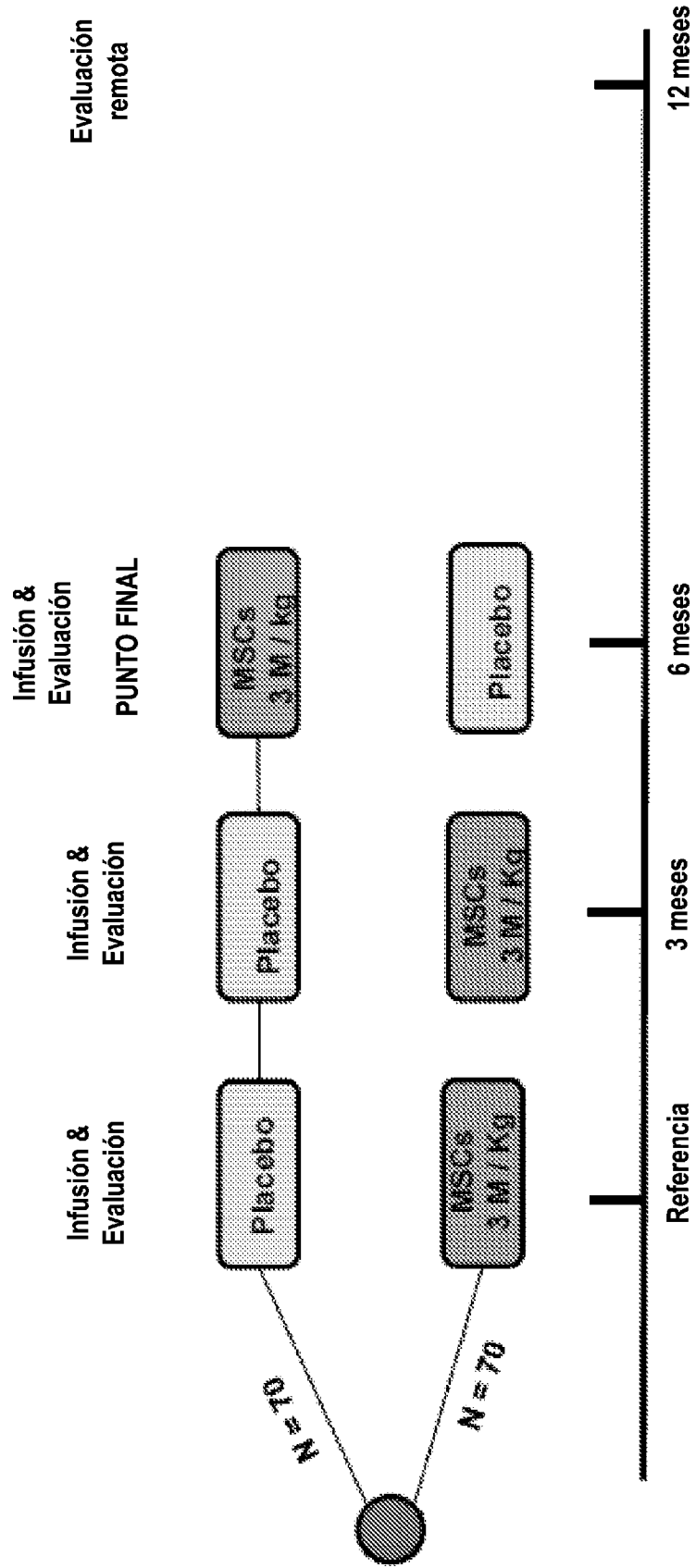


Figura 4

