



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 150**

51 Int. Cl.:
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07867360 .5**
96 Fecha de presentación : **05.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2086556**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **Poblaciones celulares mixtas para la reparación de tejidos y técnica de separación para el procesamiento celular.**

30 Prioridad: **03.11.2006 US 856504 P**
01.06.2007 US 932702 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2011

73 Titular/es: **Aastrom Biosciences, Inc.**
Domino's Farms
Lobby K 24 Frank Lloyd Wright Drive
Ann Arbor, Michigan 48105, US

72 Inventor/es: **Hampson, Brian;**
Goltry, Kristin;
Smith, Douglas M.;
Rowley, Jonathan A. y
Venturi, Naia

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 362 150 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

Poblaciones celulares mixtas para la reparación de tejidos y técnica de separación para el procesamiento celular.

5 La presente invención se refiere a composiciones de poblaciones celulares mixtas, a su utilización posterior *in vivo* para la reparación de tejidos, y a procedimientos, dispositivos y sistemas para la preparación de las poblaciones celulares mixtas. Los procedimientos de la invención también resultan aplicables a la separación de cualquier tipo de célula (adherente, no adherente o una mezcla de las mismas) o partículas de pequeño tamaño (por ejemplo de tamaño celular) respecto a un líquido o solución que las contiene.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La medicina regenerativa aprovecha, de un modo focalizado clínicamente, la capacidad de las células regenerativas, por ejemplo de las células madre y/o de las células progenitoras (es decir, las células parentales no especializadas del cuerpo) de renovarse indefinidamente y de desarrollar células especializadas maduras. Se encuentran células madre en los embriones durante las etapas tempranas del desarrollo, en tejido fetal y en algunos órganos y tejidos adultos. Las células madre embrionarias (en lo sucesivo denominadas "ESCs") es conocido que pueden convertirse en muchos, o incluso en todos, los tipos de células y tejidos del cuerpo. Las ESCs no sólo contienen toda la información genética del individuo, sino que también contienen la capacidad naciente de convertirse en cualquiera de los más de 200 tipos de células y tejidos del cuerpo. De esta manera, estas células presentan un potencial tremendo para la medicina regenerativa. Por ejemplo, las ESCs pueden cultivarse para formar tejidos específicos tales como corazón, pulmón o riñón, que después podrían utilizarse para reparar órganos dañados o enfermos. Sin embargo, los tejidos derivados de las ESCs presentan limitaciones clínicas. Debido a que las ESCs se derivan necesariamente de otro individuo, es decir de un embrión, existe un riesgo de que el sistema inmunológico del receptor rechazará el nuevo material biológico. Aunque se dispone de fármacos inmunosupresores para impedir dicho rechazo, también es conocido que dichos fármacos bloquean respuestas inmunológicas deseables, tales como aquéllas dirigidas contra infecciones bacterianas y virus.

25

30 Además, el debate ético sobre el origen de las ESCs, es decir los embriones, es intenso y supone un obstáculo adicional y tal vez insuperable para el futuro previsible.

35 Las células madre adultas (en lo sucesivo denominadas intercambiamente "ASCs") representan una alternativa a la utilización de las ESCs. Las ASCs residen silenciosamente en muchos tejidos no embrionarios, presumiblemente a la espera de responder a un traumatismo u otros procesos patológicos destructivos, de manera que pueden cicatrizar el tejido dañado. Notablemente, la nueva evidencia científica indica que cada individuo porta un grupo de ASCs que podrían compartir con las ESCs la capacidad de convertirse en muchos, incluso en todos, los tipos de células y tejidos. De esta manera, las ASCs, al igual que las ESCs, presentan un potencial tremendo de aplicaciones clínicas en la medicina regenerativa.

40 Se ha demostrado la existencia de poblaciones de ASC en uno o más de entre médula ósea, piel, músculo, hígado y cerebro. Sin embargo, la frecuencia de las ASCs en dichos tejidos es reducida. Por ejemplo, se estima que la frecuencia de las células madre mesenquimales en la médula ósea es de entre 1 en 100.000 y 1 en 1.000.000 de células nucleadas. De esta manera, cualquier aplicación clínica propuesta de las ASCs de dichos tejidos requiere incrementar el número celular, la pureza y la madurez mediante procedimientos de purificación y cultivo celulares.

45

50 Aunque las etapas de cultivo celular podrían proporcionar un incremento del número, pureza y madurez celulares, suponen un coste. Este coste puede incluir una o más de las dificultades técnicas siguientes: pérdida de la función celular debido al envejecimiento celular, pérdida de poblaciones celulares potencialmente útiles, retrasos en la aplicación potencial de las células en los pacientes, un mayor coste monetario, riesgo incrementado de contaminación celular por microorganismos ambientales durante el cultivo, y necesidad de un procesamiento adicional posterior al cultivo para agotar los materiales de cultivo contenidos conjuntamente con las células recolectadas.

55 Más específicamente, todos los productos celulares finales deben cumplir los estrictos requisitos impuestos por la Federal Drug Administration (FDA). La FDA requiere que todos los productos celulares finales deben minimizar las proteínas "extrañas" que es conocido que son capaces de producir efectos alérgicos en sujetos humanos, así como de minimizar los riesgos de contaminación. Además, la FDA espera una viabilidad celular mínima del 70%, y cualquier procedimiento debería superar consistentemente este requisito mínimo.

60 Aunque se dispone de métodos y aparatos para separar las células de componentes disueltos de cultivo no deseados y una diversidad de aparatos se encuentran actualmente en uso, dichos métodos y aparatos adolecen de un problema significativo: daños celulares causados por fuerzas mecánicas aplicadas durante el procedimiento de separación, que se manifiesta, por ejemplo, en una reducción de la viabilidad y función biológica de las células y en un incremento del ADN y residuos celulares libres. Además, puede producirse una pérdida significativas de células debido a la incapacidad de transferir todas las células al aparato de separación, así como de extraer todas las

65

células del mismo. Además, para poblaciones celulares mixtas, dichos métodos y aparatos pueden provocar un desplazamiento del perfil celular debido a la pérdida preferente de subpoblaciones de células de mayor tamaño, que son más frágiles.

5 De esta manera, existe una necesidad en el campo de la terapia celular, tal como la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos y la ingeniería de tejidos, de composiciones celulares listas para la administración directa en el paciente, que presenten una viabilidad y funcionalidad sustancialmente elevadas, y con un agotamiento sustancial de materiales requeridos para el cultivo y la recolección de las células. Además, existen necesidades de procedimientos y dispositivos fiables que permitan la producción de dichas composiciones para que resulten
10 adecuadas para la implementación clínica y para la comercialización a gran escala de las composiciones como productos de terapia celular.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

15 La invención proporciona composiciones para la reparación de tejidos. Las composiciones resultan útiles para el tratamiento de una diversidad de enfermedades y trastornos tales como las condiciones isquémicas (por ejemplo la isquemia de las extremidades, la insuficiencia cardiaca congestiva, la isquemia cardiaca, la isquemia renal y la ESRD, un ictus, y la isquemia ocular), las condiciones que requieren la regeneración de órganos o tejidos (por ejemplo la regeneración de hígado, páncreas, pulmón, glándula salivar, vasos sanguíneos, hueso, piel, cartílago,
20 tendón, ligamentos, cerebro, cabello, riñón, músculo, músculo cardiaco, nervios y extremidades), las enfermedades inflamatorias (por ejemplo las enfermedades cardíacas, la diabetes, las lesiones de la médula espinal, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la inflamación debido a la prótesis o revisión de cadera, la enfermedad de Cröhn, y la enfermedad de injerto contra huésped) y las enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo la diabetes de tipo 1, la soriasis, el lupus sistémico y la esclerosis múltiple).

25 En un aspecto la invención proporciona una composición de células aisladas para la reparación de tejidos, que comprende una población mixta de células. Las células se encuentran en una solución de electrolitos de grado farmacéutico que resulta adecuada para la administración en el ser humano. Las células se derivan de células mononucleares. Por ejemplo las células se derivan de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical e hígado fetal. Las células son de linaje hematopoyético, mesenquimal y endotelial. La viabilidad de las células es por lo menos de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. El número total de células viables en la composición es de entre 35 y 300 millones, y el volumen, inferior a 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 7,5 ml, 5 ml o inferior. Por lo menos 5% de las células viables en la composición con CD90⁺. Por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% o más son CD90⁺. En algunos aspectos, por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 50% o más de las
35 CD90⁺ coexpresan CD15. Preferentemente, las células son CD90⁺ de viabilidad comprendida entre aproximadamente 5% y 75%, siendo las restantes células en la composición, CD45⁺. Las células CD45⁺ son CD14⁺, CD34⁺ o VEGFR1⁺.

40 Las células producen por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más citoquinas antiinflamatorias o factores angiogénicos. Entre las citoquinas antiinflamatorias se incluyen, por ejemplo, antagonista de receptor de interleuquina-1, interleuquina-6, TGF- β , interleuquina-8, interleuquina-10 o proteína-1 quimioatrayente de monocitos. Entre los factores angiogénicos se incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina 1, angiopoyetina 2 o factor de crecimiento de hepatocitos. Además, las células producen menos de 50 pg/ml, 40 pg/ml, 30 pg/ml, 20 pg/ml, 10 pg/ml, 5 pg/ml, 2 pg/ml ó 1 pg/ml cada periodo de 24 horas por cada 10⁵ células, de una o
45 más citoquinas proinflamatorias tales como interleuquina-1 alfa, interleuquina-1 beta, interferón gamma o interleuquina-12. Las células también expresan indolamina-2,3-dioxigenasa, PD-1 ó ambas.

50 La composición se encuentra sustancialmente libre de componentes utilizados durante la producción de la composición celular, por ejemplo componentes del cultivo celular tales como albúmina de suero bovino, suero de caballo, suero fetal bovino, reactivo de recolección enzimáticamente activo (por ejemplo tripsinas, colagenasas, enzimas derivados de microbios, agentes de disociación, proteasas o mezclas de los mismos) y sustancialmente libre de micoplasmas, endotoxinas y contaminación microbiana. La composición contiene 2, 1, 0,1, 0,05 mg/l o inferior de albúmina de suero bovino y 1, 0,1, 0,05 mg/ml o inferior de reactivo de recolección enzimáticamente activo.

55 Opcionalmente, la composición contiene además una matriz biocompatible tal como, por ejemplo, partículas de hueso desmineralizado, partículas de hueso mineralizado, cerámica sintética de la familia del fosfato cálcico (por ejemplo fosfatos alfa-tricálcicos, fosfatos beta-tricálcicos e hidroxipatitos), colágenos, materiales basados en polisacáridos (por ejemplo hialuronano y alginatos), materiales poliméricos biodegradables sintéticos (por ejemplo poliláctidos, poliglicólidos, polifumaratos y polietilenglicol) y mezclas, combinaciones o mezclas uniformes de los
60 mismos.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los significados entendidos por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención.
65 Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la

práctica o ensayo de la invención, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

5 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y reivindicaciones detalladas siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 Otros diversos objetivos, características y ventajas concomitantes de la presente invención se apreciarán más completamente a medida que se entienda mejor la misma a partir de la descripción detallada siguiente considerada haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los que cada número de referencia designa una parte igual o correspondiente en la totalidad de las diversas vistas, y en las que:

La figura 1 es un diagrama que ilustra los componentes principales de un sistema de producción celular.

15 La figura 2 es una ilustración esquemática de una realización del sistema global de la figura 1.

La figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra otra realización del sistema global de la figura 1.

Las figuras 4A y 4B son vistas esquemáticas superior y lateral de una realización de un casete celular.

La figura 5 es una vista en despiece del casete celular de las figuras 4A y 4B.

La figura 6 es una vista esquemática que muestra el encaminamiento de los conductos de fluido en el casete celular.

20 La figura 7 es una vista esquemática de una sección de la parte de cámara biológica de un casete celular.

Las figura 8A y 8B son vistas superior y en sección de una tapa de cámara biológica.

Las figuras 9A y 9B son vistas superior y en sección de un disco de lecho celular de una cámara biológica.

Las figuras 10A y 10B son vistas superior y en sección de la base de una cámara biológica.

25 La figura 11 es un gráfico de columnas que muestra la proporción de lavado de recolección/lavado CYTOMATE[®] para el % de viabilidad celular posteriores al lavado, a la concentración y al almacenamiento, % de CD90, % de CD14auto⁺, % de VegfR1⁺, la frecuencia de CFU-F y de CFU-GM y la albúmina de suero bovino (BSA) residual.

30 La figura 12 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de proporciones de lavado de recolección/lavado CYTOMATE[®] para el total de células viables posteriormente al lavado, el producto final de células viables totales, las células CD90⁺ viables totales, las células CD14⁺ auto⁺ viables totales, las células VEGFR1⁺ viables totales, los CFU-Fs totales y las CFU-GMs totales.

La figura 13 es un gráfico de columnas que muestra la proporción de frecuencias CFU-F (Lavado de recolección)/(lavado CYTOMATE[®]).

35 La figura 14 es un gráfico de columnas que muestra las CFU-Fs por dosis de TRCs. Se utilizó el recuento de células viables posterior al lavado medido mediante Nucleocounter para calcular las CFU-Fs/dosis, excepto en los casos en que no se encontraba disponible, y se utilizaron datos de azul tripán (muestras 106-70 y 106-72). En cada pareja de columnas de cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados obtenidos utilizando el lavado CYTOMATE[®] y la columna derecha muestra los resultados utilizando el lavado de recolección.

La figura 15 es un gráfico de columnas que muestra la proporción de frecuencias CFU-GM (Lavado de recolección)/(lavado CYTOMATE[®]).

40 La figura 16 es un gráfico de columnas que muestra las CFU-GMs por dosis de TRCs. Se utilizó el recuento de células viables posterior al lavado medido mediante Nucleocounter para calcular las CFU-GMs/dosis, excepto en los casos en que no se encontraba disponible, y se utilizaron datos de azul tripán (muestras 106-70 y 106-72). En cada pareja de columnas de cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados obtenidos utilizando el lavado CYTOMATE[®] y la columna derecha muestra los resultados utilizando el lavado de recolección.

45 La figura 17 es un gráfico de columnas que muestra la viabilidad total de las TRCs tras la administración mediante inyección medida mediante Nucleocounter tras llevar a cabo el lavado de recolección. La columna izquierda representa el control, la columna intermedia representa una aguja de calibre 25 y la columna derecha representa una aguja de calibre 30 para cada experimento.

50 La figura 18 es un gráfico de columna que muestra la viabilidad total de las TRCs tras la administración mediante inyección medida mediante Nucleocounter tras llevar a cabo el lavado CYTOMATE[®]. La columna izquierda representa el control, la columna intermedia representa una aguja de calibre 25 y la columna derecha representa

una aguja de calibre 30 para cada experimento.

- 5 La figura 19 es un gráfico de columnas que muestra las CFU-Fs tras un almacenamiento de 24 horas y la administración por inyección. En cada pareja de columnas de cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados obtenidos utilizando el lavado CYTOMATE[®] y la columna derecha muestra los resultados utilizando el lavado de recolección.
- La figura 20 es un gráfico de columnas que muestra la dosis de citoquinas normalizada del lavado de recolección/lavado CYTOMATE[®] para varias citoquinas en TRCs.
- La figura 21 es un gráfico de columnas que muestra el potencial osteogénico de las TRCs de lavado CYTOMATE[®] y las TRCs del lavado de recolección.
- 10 La figura 22A es un gráfico de columnas que muestra la cantidad de calcio producido por cada célula CD90+ sembrada en placa para TRCs y células madre mesenquimales (MSCs).
- La figura 22B es un gráfico de columnas que muestra la cantidad de calcio producido por cada célula CD90+ sembrada en placa para TRCs y células madre mesenquimales (MSCs).
- 15 La figura 23A muestra un análisis de citometría de flujo de las TRCs producidas utilizando el lavado de recolección teñido para el análisis de dos colores utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) de control irrelevantes de isotipo correspondiente (IgG1, IgG2a).
- La figura 23B muestra un análisis de citometría de flujo de las TRCs producidas utilizando el lavado de recolección teñido con anticuerpos monoclonales anti-CD25 más anti-CD4 (mAbs) conjugados con fluorocromo específicos.
- 20 La figura 23C es un gráfico de columnas que muestra el perfil de secreción de citoquinas de células T en la mezcla de TRCs tras la activación específica con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb) denominado OKT3. Este anticuerpo monoclonal entrecruza el complejo de superficie celular de receptor de células T (TCR)-CD3, activando de esta manera la liberación de citoquinas de las células T. Se utilizó el análisis Luminex[®] para evaluar la liberación de IL-2, IFN γ e IL-10 al líquido sobrenadante recogido 48 horas después de la activación de las células T utilizando el mAb OKT3.
- 25 La figura 24 es un gráfico de columnas que muestra la cantidad relativa de mensajero indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) expresado en las TRCs inducidas por IFN γ según determinación mediante reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR). Se muestra la media de muestras por triplicado para cada determinación.
- La figura 25 es una transferencia western que muestra la expresión de proteína indolamina-2,3-dioxigenasa en TRCs inducidas por CFN γ .
- 30 La figura 26 es un gráfico de columnas que muestra la producción de HGF por parte de las TRCs.
- La figura 27 es un gráfico de columnas que muestra el porcentaje de células positivas para IDO en TRCs inducidas por IFN γ según determinación mediante citometría de flujo.
- La figura 28 es un gráfico de columnas que muestra el porcentaje de células positivas para PDL1 en TRCs inducidas por IFN γ según determinación mediante citometría de flujo.
- 35 La figura 29A es un gráfico que muestra la incorporación de ³H-timidina en una respuesta alogénica de leucocitos mixtos (MLR) en presencia de células T alogénicas y dendríticas en comparación con la presencia de TRCs.
- La figura 29B es un gráfico que muestra la incorporación de ³H-timidina en una respuesta alogénica de leucocitos mixtos (MLR) en presencia de células T alogénicas más células dendríticas en comparación con la presencia de TRCs.
- 40 La figura 30 es un gráfico de columnas que muestra la incorporación de ³H-timidina en una respuesta alogénica de leucocitos mixtos (MLR) en presencia de células T alogénicas conjuntamente con dosis crecientes de TRCs sin (no inducidas) o con (inducidas) exposición a IFN γ .
- La figura 31 muestra fotografías de rayos X de un paciente que había caído desde un andamio y había sido tratado con TRCs para la fractura de ambas tibias.
- 45 La figura 32A muestra una fotomicrografía de la histología del hueso nuevo en un callo en cicatrización.
- La figura 32B muestra una fotomicrografía de campo brillante de la histología de vasos sanguíneos y hueso nuevo que penetra en un aloinjerto.
- La figura 32C muestra una fotomicrografía de luz polarizada de la histología de vasos sanguíneos y hueso nuevo que penetra en un aloinjerto.

La figura 33A es una fotografía de una mezcla implantable de TRC/matriz de hueso desmineralizado (DBM) que se ha ligado con plasma autólogo.

La figura 33B es una fotomicrografía de una tinción Live/Dead de 24 horas de la mezcla TRC/DBM a 4X.

5 La figura 34A es un gráfico que muestra que las TRCs en el aloinjerto RC/DBM son viables tras la mezcla y que proliferan durante un periodo de dos semanas.

La figura 34B es una fotomicrografía de una tinción Live/Dead de 14 días de la mezcla TRC/DBM a 4X.

La figura 35 proporciona gráficos que muestran que las TRCs mantienen la secreción de osteocalcina, IL-6, osteoprotegerina y VEGF durante la totalidad de las dos semanas de cultivo en una mezcla TRC/DBM.

10 La figura 36 son fotografías que muestran un dedo del pie de un paciente varón de 69 años de edad tratado con TRCs. Antes del tratamiento (izquierda) se observaba una herida que no cicatrizaba. Cuarenta y cuatro semanas después del tratamiento (derecha) se observó una cicatrización completa. El paciente sufrió numerosas comorbilidades, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión e hiperlipidemia.

15 La figura 37 son fotografías que muestran una MR-angiografía de las extremidades de un paciente varón de 69 años de edad tratado con TRCs. Este paciente recibió inyecciones de TRCs en la extremidad derecha. Antes del tratamiento (panel izquierdo) se observó un nivel muy bajo de colateralización.

Cuarenta y ocho semanas después del tratamiento (panel derecho) podía observarse un nivel significativamente superior de colaterales en la extremidad tratada. El paciente sufrió numerosas comorbilidades, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, hipertensión e hiperlipidemia.

20 La figura 38 es un gráfico de columnas que muestra el incremento o la reducción de determinados tipos celulares en las TRCs en comparación con las BM MNCs.

La figura 39 es una ilustración que muestra la frecuencia de elementos hematopoyéticos y mesenquimales en las BM MNCs y en las TRCs.

25 La figura 40 es un gráfico de columnas que muestra que los perfiles de producción de citoquinas eran significativamente diferentes en las BM MNCs y TRCs del mismo donante.

La figura 41 A-C es una serie de gráficos de columnas que muestra la frecuencia de CD90 y CFU-f en cultivos de MSCs y TRCs. Se generaron MSCs y TRCs en el sistema biorreactor automático tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La frecuencia de CD90 y CFU-f en el cultivo final se muestra en A. y B., respectivamente. A continuación, se calculó la frecuencia CFU-f basándose en el número de células CD90 en cada producto. Se muestran los resultados en C. Las columnas negras representan los cultivos de TRCs y las columnas blancas representan los cultivos de MSCs. Se muestran dos donantes normales independientes.

30

La figura 42 es un gráfico de líneas que muestra una comparación entre la formación de hueso *in vivo* y un modelo ectópico de ratón. Se determinaron puntuaciones óseas para cada densidad celular de carga procedente de cultivos de MSCs y de TRCs; el gráfico muestra la dosis de carga calculada de células CD90⁺ de cada cultivo. Los resultados presentados son de un experimento representativo de un donante normal. En este experimento, las MRCs eran 68% CD90⁺ y las TRCs eran 22% cCD0⁺.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La presente invención se basa en el descubrimiento de composiciones y métodos de producción de células para la terapia celular. Las composiciones son una población mixta de células enriquecida en células madre y progenitoras que resultan especialmente adecuadas para la administración en el ser humano para la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos y la ingeniería de tejidos. Dichas células se denominan en la presente memoria "células de reparación de tejidos", o "TRCs".

45

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto la invención proporciona una composición que contiene una población mixta de células de linajes hematopoyético, mesenquimal y endotelial. La composición resulta adecuada para la administración en un ser humano para la utilización terapéutica. Las TRCs se producen a partir de un procedimiento de cultivo *in vitro*. Tras completar el procedimiento de cultivo, los componentes del cultivo (por ejemplo el medio de cultivo, el enzima utilizado para desenganchar y recolectar las células) deben separarse de las células antes de que puedan administrarse con seguridad en un sujeto que requiere la regeneración de tejidos. Esta separación se lleva a cabo convencionalmente en una etapa de lavado celular posterior al cultivo. Sin embargo, un problema significativo asociado a esta etapa es el daño celular causado por fuerzas mecánicas aplicadas durante estos procedimientos, que se manifiesta, por ejemplo, en una reducción de la viabilidad y la función biológica de las células y en un incremento del ADN celular libre y de los residuos. Esta pérdida de viabilidad y función presenta no sólo un impacto

50

55

inmediato sobre el producto celular, sino que también presenta un gran impacto sobre la vida de almacenamiento y el potencial de conservación criogénica de las células. Además, puede producirse una pérdida significativa de células debido a la incapacidad de transferir todas las células al aparato de separación, así como durante la extracción de todas las células del aparato.

Por consiguiente, en otro aspecto la invención proporciona un procedimiento de lavado celular. Las técnicas de lavado celular de la presente invención, tal como se describe en la sección de métodos de producción de TRCs, posteriormente, inesperadamente incrementaron en gran medida la viabilidad y rendimiento celulares en comparación con los procedimientos de lavado posteriores al cultivo actuales, proporcionando simultáneamente composiciones celulares con niveles residuales de componentes de cultivo que resultan suficientemente bajos para la administración segura de las células en un paciente.

Células de reparación de tejidos (TRCs)

Las células de reparación de tejidos (TRCs) proporcionan una composición celular y molecular de elevada funcionalidad para la reparación de tejidos dañados. Además, se ha demostrado que las TRCs presentan efectos antiinflamatorios. Las TRCs contienen una mezcla de células de linajes hematopoyético, mesenquimal y endotelial producidas a partir de células mononucleares. Las células mononucleares se aíslan a partir de tejidos adultos, juveniles, fetales o embrionarios. Por ejemplo, las células mononucleares se derivan de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y tejido hepático fetal. Las TRCs son producidas a partir de células mononucleares, por ejemplo mediante un procedimiento de cultivo *in vitro* que resulta en una composición celular única que presenta diferencias tanto fenotípicas como funcionales en comparación con la población de células mononucleares utilizada como material de partida. Además, las TRCs de la presente invención presentan tanto una viabilidad elevada como niveles residuales bajos de componentes utilizados durante su producción.

La viabilidad de las TRCs es de por lo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. La viabilidad se mide mediante métodos conocidos de la técnica, tales como la exclusión de azul tripán. Esta viabilidad incrementada resulta en que la población de TRCs es más efectiva en la reparación de tejidos, y en que incrementa la vida de alimentación y el potencial de conservación criogénica del producto celular final.

La expresión "componentes utilizados durante la producción" se refiere, aunque sin limitación, a componentes medios de cultivo tales como soluciones de suero de caballo, de suero fetal bovino y de enzimas, para la recolección celular. Entre las soluciones enzimáticas se incluyen tripsinas (de origen animal, microbiano o recombinantes), diversas colagenasas, enzimas de origen microbiano alternativos, agentes de disociación, proteasas generales o mezclas de los mismos. La eliminación de dichos componentes permite la administración segura de las TRCs en un sujeto que las necesita.

Preferentemente, las composiciones de TRCs de la invención contienen menos de 10, 5, 4, 3, 2 ó 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6 ó 0,5 mg/ml de enzimas de recolección (según determinación de la actividad enzimática) y se encuentran sustancialmente libres de micoplasmas, endotoxinas y contaminación microbiana (por ejemplo aeróbica, anaeróbica y fúngica).

La expresión "sustancialmente libre de endotoxinas" se refiere a la presencia de menos endotoxina por dosis de TRCs de la permitida por la FDA para un compuesto biológico, que es un contenido total de endotoxinas de 5 EU/kg de peso corporal al día, que para una persona media de 70 kg son 350 EU por dosis total de TRCs.

La expresión "sustancialmente libre de contaminación por micoplasmas y microbiana" se refiere a lecturas negativas para los ensayos aceptados generalmente y conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo la contaminación por micoplasmas se determina mediante el subcultivo de una muestra de producto TRCs en medio de caldo y distribuido en placas de agar los días 1, 3, 7 y 14 a 37°C con controles positivos y negativos apropiados. La apariencia de la muestra de producto se compara microscópicamente a 100X con las de los controles positivo y negativo. Además, la inoculación de un cultivo celular indicador se incuba durante 3 y 5 días y se examina a 600x para la presencia de micoplasmas mediante microscopía de epifluorescencia utilizando un fluorocromo ligante de ADN. El producto se considera satisfactorio en el caso de que el procedimiento en medio agar y/o caldo y el procedimiento de cultivo celular indicador no muestren evidencia de contaminación por micoplasmas.

El ensayo de esterilidad para establecer que el producto se encuentra libre de contaminación microbiana se basa en el método de transferencia directa de la Farmacopea U.S. Este procedimiento requiere la inoculación de un efluente de medio pre-recolección y de una muestra pre-concentrada en un tubo que contenga medio caldo de soja tríplica y medio de tioglicolato líquido. Estos tubos se observan periódicamente para detectar una apariencia turbia (turbidez) durante una incubación de 14 días. Una apariencia turbia cualquier día en cualquiera de los medios indica contaminación, mientras que una apariencia transparente (ausencia de crecimiento) es un resultado de ensayo que indica sustancialmente libre de contaminación.

Se determinó la capacidad de las células de entre las TRCs de formar colonias clonogénicas en comparación con

las BM-MNCs. Se realizó un seguimiento de las colonias tanto hematopoyéticas (CFU-GM) como mesenquimales (CFU-F) (Tabla 1). Tal como se muestra en la Tabla 1, mientras que las CFU-F se incrementaron 280 veces, las CFU-GM se redujeron ligeramente en el cultivo.

Tabla 1

	Introducción de BM MNC (x10 ⁶)	Producción de TRCs (x10 ⁶)	Factor de expansión
CFU-GM	1,7	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1
CFU-F	0,03	6,7 ± 1,3	280 ± 67

Los resultados son de medias ± SEM de 8 experimentos a escala clínica

5

Las células de la composición de TRCs se han caracterizado a partir de la expresión de marcadores de superficie celular. La Tabla 2 muestra el fenotipo típico medido mediante citometría de flujo para las BM-MNCs y TRCs iniciales (ver la Tabla 2). Estas diferencias fenotípicas y funcionalmente diferencian claramente las TRCs de las composiciones iniciales de células mononucleares.

Tabla 2

Linaje	Marcador	Entrada de BM MNC		Producción de TRCs		Factor de expansión
		%	Total (en millones)	%	Total (en millones)	
M	CD105/166	0.03	0.1	12	16	373
H	CD14auto+	0.2	0.5	26	36	81
M	CD90	0.4	0.9	22	28	39
H (E)	CXCR4/VEGFR1	0.7	1.9	12	9.9	21
E	CD144/146	0.5	1.3	2.7	3.2	6.3
E	VEGFR1	7.6	22	26	38	2.3
E	VEGFR2	12	37	25	37	1.3
H	CD14auto-	11	31	14	17	0.9
H	CD11b	59	162	64	83	0.5
H	CD45	97	269	80	104	0.4
H	CD3	24	67	8.6	11	0.2

M = linaje mesenquimal, H = linaje hematopoyético, E = linaje endotelial. Los resultados son de medias 4 experimentos a escala clínica

10

Se examinaron los marcadores de linajes hematopoyéticos, mesenquimales y endoteliales. Los resultados de medias de los 4 experimentos de comparación entre las BM-MNCs iniciales y el producto de TRCs se muestran en la figura 38. La mayoría de las células del linaje hematopoyético, incluyendo las mieloides CD11b, los monocitos CD14auto, las progenitoras de CD34 y las linfoides CD3, se redujeron ligeramente, mientras que los macrófagos CD14auto+ se expandieron 81 veces. Las células mesenquimales, definidas como CD90⁺ y CD105⁺/166⁺/45⁺/14⁻ presentaban factores de expansión de hasta 373. Las células que podrían estar implicadas en la vascularización, incluyendo las células endoteliales vasculares maduras (CD144/146) y las células de soporte CXCR4/VEGFR1⁺ se expandieron 6 a 21 veces.

15

20

Aunque la mayoría de las células del linaje hematopoyético no se expandieron en estos cultivos, el producto final todavía contenía aproximadamente 80% de células hematopoyéticas CD45⁺ y aproximadamente 20% de células mesenquimales CD90⁺ (figura 39).

25

Las TRCs se encontraban altamente enriquecidas en células CD90⁺ en comparación con la población de células mononucleares de la que se derivaron. Las células en la composición de TRCs era por lo menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o más CD90⁺. Las células restantes en la composición de TRCs eran CD45⁺. Preferentemente, las células en la composición de TRCs eran aproximadamente 5% a 75% CD90⁺ viables. En diversos aspectos, por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% o más de las CD90⁺ también son CD15⁺ (ver la Tabla 3). Además, las CD90⁺ también son CD105⁺.

30

Tabla 3

	Análisis 1 de TRCs	Análisis 2 de TRCs
% de CD90 ⁺	29,89	18,08
% de CD90 ⁺ CD15 ⁻	10,87	3,18

% de CD90 ⁺ CD15 ⁺	19,02	14,90
% de CD15 ⁺ de las CD90s	63,6	82,4

En contraste, la población de CD90 en las células mononucleares de médula ósea (BMMNC) típicamente supone menos de 1%, con las células CD45⁺ resultantes constituyendo más de 99% de las células nucleadas de las BMMNCs. De esta manera, se produce una reducción significativa de muchas de las células hematopoyéticas maduras en la composición de TRCs en comparación con la población inicial de células mononucleares (ver la Tabla 2).

Esta combinación única de células madre hematopoyéticas, mesenquimales y endoteliales no sólo es diferente de las células mononucleares, sino también de otras poblaciones celulares utilizadas actualmente en la terapia celular. La Tabla 4 muestra el perfil de marcadores de superficie celular de las TRCs en comparación con el de las células madre mesenquimales y de las células madre derivadas de tejido adiposo (Deans R.J., Moseley A.B. 2000. *Exp. Hematol.* 28: 875-884; Devine S.M. 2002. *J Cell Biochem Supp* 38: 73-79; Katz A.J. *et al.* 2005. *Stem Cells.* 23:412-423; Gronthos S. *et al.* 2001. *J. Cell. Physiol.* 189:54-63; Zuk P.A. *et al.* 2002. *Mol. Biol. Cell.* 13: 4279-95). Por ejemplo, las células madre mesenquimales (MSCs) se encuentran altamente enriquecidas en CD90⁺ (más de 95% CD90⁺), con un porcentaje muy bajo (o nulo) de CD45⁺. Las células madre derivadas del tejido adiposo son más variables, aunque típicamente también son más de 95% CD90⁺, con prácticamente ninguna célula sanguínea CD45⁺ como parte de la composición. También se encuentran presentes células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs), que se cultivan a partir de BMMNCs y resultan en una población CD90 pura diferente de las MSCs que coexpresan CD49c. Otras células madre utilizadas son tipos celulares altamente purificados, incluyendo células CD34⁺, células AC133⁺ y células CD34⁺lin⁻, que naturalmente presentan pocas o ninguna CD90⁺ como parte de la composición y que de esta manera son sustancialmente diferentes de las TRCs.

El análisis de marcadores celulares también ha demostrado que las TRCs aisladas según los métodos de la invención presentan porcentajes más altos de células CD14⁺ auto⁺, CD34⁺ y VEGFR⁺.

Tabla 4

Locus CD	Nombre común	TRC	Células madre mesenquimales	Células madre derivadas del tejido adiposo
CD 34	-	+	-	6
CD13	gp150	+	Na	+
CD15	LewisX, SSEA-1	+	-	-
CD11b	Mac-1	+	-	6
CD14	Receptor LPS	+	-	-
CD235a	glicoforina A	+	Na	Na
CD45	Antígeno leucocitario común	+	-	-
CD90	Thy1	+	+	+
CD105	Endoglina	+	+	+
CD166	ALCAM	+	+	+
CD44	Receptor hialuronato	+	+	+
CD133	AC133	+	-	6
-	vWF	+	Na	Na
CD144	VE-Cadherina	+	-	+
CD146	MUC18	+	+	Na
CD309	VEGFR2, KDR	+	Na	Na

Cada uno de los tipos celulares presente en una población de TRCs presenta propiedades inmunomoduladoras variables. Los monocitos/macrófagos (CD45⁺, CD14⁺) inhiben la activación de las células T; además, los macrófagos muestran la expresión de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). (Munn D.H. y Mellor A.L., *Curr Pharm Des.* 9:257-264, 2003; Munn D.H. *et al.* *J. Exp. Med.*, 189:1363-1372, 1999; Mellor A.L. y Munn D.H., *J. Immunol.* 170:5809-5813, 2003; Munn D. H. *et al.*, *J. Immunol.* 40:156:523-532, 1996). Los monocitos y macrófagos regulan la inflamación y la reparación de tejidos (Duffield J.S., *Clin Sci (Lond)* 104:27-38, 2003; Gordon S., *Nat. Rev. Immunol.* 3:23-35, 2003;

Mosser D.M., *J. Leukoc. Biol.* 73:209-212, 2003; Philippidis P. *et al.*, *Circ. Res.* 94:119-126, 2004. Estas células también inducen tolerancia e inmunosupresión en el trasplante (Fandrich F. *et al.* *Hum. Immunol.* 63:805-812, 2002). Las células T reguladoras (CD45⁺ CD4⁺ CD25⁺) regulan la respuesta inflamatoria innata tras la lesión (Murphy T.J. *et al.*, *J. Immunol.* 174:2957-2963, 2005). Las células T también son responsables del mantenimiento de la autotolerancia y de la prevención y supresión de las enfermedades autoinmunitarias (Sakaguchi S. *et al.*, *Immunol. Rev.*, 182:18-32, 2001; Tang Q. *et al.*, *J. Exp. Med.* 199:1455-1465, 2004). Las células T también inducen y mantienen la tolerancia al trasplante (Kingsley C.I. *et al.*, *J. Immunol.* 168:1080-1086, 2002; Graca L. *et al.*, *J. Immunol.* 168:5558-5565, 2002) e inhiben la enfermedad de injerto contra el huésped (Ermann J. *et al.*, *Blood* 105:2220-2226, 2005; Hoffmann P. *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293:265-285, 2005; Taylor P.A. *et al.*, *Blood* 104:3804-3812, 2004). Las células madre mesenquimales (CD45⁺ CD90⁺ CD105⁺) expresanIDO e inhiben la activación de las células T (Meisel R. *et al.*, *Blood* 103: 4619-4621, 2004; Krampera M. *et al.*, *Stem Cells*, 2005), así como inducen actividad antiinflamatoria (Aggarwal S. y Pittenger M.F., *Blood* 105:1815-1822, 2005).

Las TRCs también muestran una expresión incrementada del ligando-1 de muerte programada (PDL1). La expresión incrementada de PDL1 se asocia a la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. La expresión de PDL-1 se asocia a un estado no inflamatorio. Las TRCs presentan una expresión incrementada de PDL1 en respuesta a la inducción inflamatoria, mostrando otro aspecto de las cualidades antiinflamatorias de las TRCs.

Las TRCs, en contraste con las BM-MNCs, también producen por lo menos cinco citoquinas diferentes y un enzima regulador con potente actividad tanto de reparación de heridas como de regulación negativa controlada de la inflamación (figura 40). Concretamente las TRCs producen: 1) interleuquina-6 (IL-6), 2) interleuquina-10 (IL-10), 3) factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), 4) proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), y 5) antagonista de receptor de la interleuquina-1 (IL-1ra). Las características de estas cinco citoquinas se resume en la Tabla 5, a continuación.

25

Tabla 5. Características de las citoquinas expresadas por TRCs	
CITOQUINA	CARACTERÍSTICA
IL-1 ra	El receptor señuelo de IL-1 regula negativamente la inflamación. IL-1ra e IL-10 son producidos característicamente por macrófagos activados alternativamente
IL-6	La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica con un amplio abanico de actividades biológicas. Esta citoquina regula la polarización de las células T CD4 ⁺ no expuestas hacia el fenotipo Th2, estimula además la diferenciación del Th2 mediante la regulación positiva de la expresión de NFAT-1 e inhibe la diferenciación del Th1 proinflamatorio mediante la inducción del supresor de la señalización de citoquinas SOCS-1.
IL-10	Producido por tipos celulares que median en actividades antiinflamatorias, inmunidad de tipo Th2, inmunosupresión y reparación de tejidos. IL-10 e IL-1ra son producidos característicamente por macrófagos activados alternativamente IL-10 también se encuentra implicado en la inducción de las células T reguladoras. Además, las células T reguladoras secretan niveles elevados de IL-10.
MCP-1	MCP-1 inhibe la transferencia adoptiva de enfermedades autoinmunitarias en modelos animales y controla la diferenciación del TH2, indicando una propiedad antiinflamatoria particularmente en equilibrio contra MIP-1 α .
VEGF	Citoquina angiogénica con simultáneamente propiedades inmunosupresoras que actúa al nivel de célula presentadora de antígenos.

Entre las características adicionales de las TRCs se incluyen la incapacidad espontánea de producir determinados mediadores cruciales, o la producción a nivel muy reducido, los cuales es conocido que activan la ruta del TH1 proinflamatorio, incluyendo la interleuquina-alfa (IL-1 α), la interleuquina-beta (IL-1 β), el interferón gamma (IFN γ) y más notablemente la interleuquina-12 (IL-12). Resulta importante que las TRCs no producen estas últimas citoquinas de tipo TH1 espontáneamente durante la sustitución del medio o en cultivos por perfusión, ni tras la inducción deliberada con estímulos inflamatorios conocidos tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Las TRCs produjeron niveles bajos de IFN γ sólo tras la inducción de las células T por parte de mAb anti-CD3. Finalmente, las TRCs producidas por los métodos actuales producen más citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-10, así como menos citoquina inflamatoria IL-12.

Además, las TRCs pueden inducirse para la expresión de un enzima regulador inmunológico clave denominado indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Las TRCs según la presente invención expresan niveles más altos de IDO tras la inducción con interferón γ . Se ha demostrado que IDO regula negativamente las respuestas inflamatorias tanto nacientes como en curso en modelos animales y en seres humanos (Meisel R. *et al.*, *Blood*, 103:4619-4621, 2004;

40

Munn D.H. *et al.*, J. Immunol. 156:523-532, 1996; Munn D.H. *et al.*, J. Exp. Med. 189:1363-1372, 1999; Munn D.H. y Mellor A.L., Curr. Pharm. Des. 9:257-264, 2003; Mellor A.L. y Munn D.H., J. Immunol. 170:5809-5813, 2003).

5 Conjuntamente, dichas características únicas de las TRCs según la invención crean un ambiente más antiinflamatorio para la reparación de tejidos y por lo tanto son un tratamiento más efectivo para la reparación de tejidos.

10 Tal como se ha comentado anteriormente, las TRCs se encuentran altamente enriquecidas en una población de células que coexpresan CD90 y CD15.

15 La CD90 se encuentra presente en células madre y progenitoras que pueden diferenciarse en múltiples linajes. Estas células son una población heterogénea de células que se encuentra muy probablemente en diferentes estados de diferenciación. Se han identificado marcadores celulares sobre células madre de origen embrionario o fetal que definen el estado de célula madre de la célula. Uno de estos marcadores es SSEA-1, también denominado CD15. CD15 se encuentra sobre células madre embrionarias de ratón, pero no se expresa sobre las células madre embrionarias humanas. Sin embargo, se ha detectado en células madre neurales tanto de ratón como humanas. CD15 tampoco se expresa sobre células madre mesenquimales purificadas derivadas de médula ósea humana o de tejido adiposo (ver la Tabla 6). De esta manera, la población celular en las TRCs que coexpresa tanto CD90 como CD15 es una población celular única y podría definir un estado de tipo célula madre de las células CD90 derivadas del adulto.

20 Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, la población celular que expresa tanto CD90 como CD15 podría enriquecerse adicionalmente. La expresión "enriquecida adicionalmente" se refiere a que la composición celular contiene 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de células CD90⁺ CD15⁺. Las TRCs pueden enriquecerse adicionalmente en células CD90⁺ CD15⁺ mediante métodos conocidos de la técnica tales como la selección positiva o negativa utilizando anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie celular. Las TRCs que han sido enriquecidas adicionalmente para células CD90⁺ CD15⁺ resultan particularmente útiles en la reparación y regeneración del hueso.

30

Tabla 6

Fenotipo celular	TRC	MSC P0
% de CD90 ⁺	23.99	98.64
% de CD15 ⁺	39.89	0.76
% de CD90 ⁺ / CD15 ⁺	19.54	0.22
N	2	4

35 Se evaluó el CFU-F y el potencial osteogénico de las CD90⁺CD15⁺. Al eliminar las células CD90⁺, desaparecieron todas las CFUF y el potencial osteogénico *in vitro*. Inesperadamente, aunque las frecuencias globales de CD90 y CFU-F eran más altas en los cultivos de MSCs (en los que las células CD90 no expresaban CD15), el número relativo de CFU-F por cada célula CD90 era mucho más alto en las TRCs (figura 41). Esto demuestra que las células CD90 son mucho más potentes en las TRCs que al cultivarlas en forma de poblaciones de células purificadas.

40 Se midió el potencial osteogénico tanto *in vitro* como *in vivo*. Nuevamente, bajo condiciones en las que las células expresaban CD15 (TRCs), el potencial osteogénico era más alto que el observado en las células mesenquimales (figura 42).

Métodos terapéuticos

45 Las células de reparación de tejidos (TRCs) resultan útiles para una diversidad de métodos terapéuticos, entre ellos la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos y la ingeniería de tejidos. Por ejemplo, las TRCs resultan útiles para la regeneración de hueso, la regeneración cardíaca, la regeneración vascular, la regeneración neural y el tratamiento de trastornos isquémicos. Entre las condiciones isquémicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la isquemia de extremidades, la insuficiencia cardíaca congestiva, la isquemia cardíaca, la isquemia renal y la ESRD, el ictus y la isquemia ocular. Además, debido a las citoquinas inmunorreguladoras producidas por las TRCs, éstas también resultan útiles en el tratamiento de una diversidad de enfermedades inmunológicas e inflamatorias. Entre las enfermedades inmunológicas e inflamatorias se incluyen, por ejemplo, la diabetes (de tipo I y de tipo II), las enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), la enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD), la soriasis, el rechazo de las células, tejidos u órganos alogénicos (inducción de tolerancia), las enfermedades cardíacas, las lesiones de la médula espinal, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la inflamación debida a la sustitución o revisión de cadera, la enfermedad de Cröhn, enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE), la artritis reumatoide (RA) y la esclerosis múltiple (MS). En otro aspecto de la invención, las TRCs también

55

resultan útiles para inducir la angiogénesis.

Las TRCs se administran en sujetos mamíferos, por ejemplo en seres humanos, para llevar a cabo la reparación o la regeneración de tejidos. Las TRCs se administran alogénicamente o autogénicamente.

Las cualidades únicas de las TRCs polarizan fuertemente la respuesta del huésped alejándola de la ruta de destrucción de los tejidos propia de la inflamación y hacia la reparación de las lesiones, con una cicatrización rápida de los tejidos dañados. Además, algunas de las células son capaces de diferenciarse de modo específico de tejido (por ejemplo las CD90⁺ en hueso), ayudando adicionalmente a la regeneración de los tejidos. Por consiguiente, las TRCs resultan efectivas para inducir la reparación de tejidos en un amplio abanico de enfermedades.

Administración farmacéutica y formas de dosificación

Las TRCs indicadas pueden administrarse en forma de preparación o composición farmacéutica o fisiológicamente aceptable que contenga un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, y administrarse en los tejidos del organismo receptor de interés, incluyendo en seres humanos y en animales no humanos. La composición que contiene TRCs puede prepararse mediante la resuspensión de las células en un líquido o solución adecuada tal como solución salina fisiológica estéril u otros líquidos acuosos inyectables fisiológicamente aceptables. Las cantidades de los componentes que deben utilizarse en dichas composiciones pueden ser rutinariamente determinadas por el experto en la materia.

Las TRCs o composiciones de las mismas pueden administrarse aplicando las suspensiones de TRCs sobre material absorbente o adherente, es decir, una matriz de esponja de colágeno, y la inserción del material que contiene TRCs en el interior o sobre la superficie del sitio de interés. Alternativamente, las TRCs pueden administrarse por vías parenterales de inyección, entre ellas las subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal. Entre otros modos de administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, intranasal, intratecal, intracutánea, percutánea, entérica y sublingual. En una realización de la presente invención, la administración de las TRCs puede estar mediada por cirugía endoscópica.

Para la administración inyectable, la composición se encuentra en solución o suspensión estéril o puede resuspenderse en vehículos acuosos u oleaginosos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, que pueden contener conservantes, estabilizadores y material que convierte la solución o suspensión en isotónica con los líquidos corporales (por ejemplo la sangre) del receptor. Entre los ejemplos no limitativos de los excipientes adecuados para la utilización se incluyen agua, solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, solución acuosa 0,15 M de cloruro sódico, dextrosa, glicerol, etanol diluido y similares, y mezclas de los mismos. Son estabilizadores ilustrativos, polietilenglicol, proteínas, sacaridos, aminoácidos, ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, que pueden utilizarse solos o en forma de mezclas. Las cantidades, así como las vías de administración, utilizadas, se determinan caso por caso, y corresponden a las cantidades utilizadas en tipos similares de aplicaciones o indicaciones conocidos por el experto en la materia.

En consistencia con la presente invención, las TRCs pueden administrarse en tejidos corporales, incluyendo hígado, páncreas, pulmón, glándula salivar, vaso sanguíneo, hueso, piel, cartílago, tendón, ligamento, cerebro, cabello, riñón, músculo, músculo cardíaco, nervio, músculo esquelético, articulaciones y extremidades.

El número de células en una suspensión de TRCs y el modo de administración pueden variar dependiendo del sitio y condición bajo tratamiento. A modo de ejemplos no limitativos, de acuerdo con la presente invención, se inyectan aproximadamente 35×10^6 a 300×10^6 TRCs para llevar a cabo la reparación de tejidos. En consistencia con los Ejemplos dados a conocer en la presente memoria, el experto en la materia puede modular las cantidades y métodos de los tratamientos basados en TRCs según los requisitos, limitaciones y/o optimizaciones determinadas para cada caso.

En realizaciones preferentes, la composición farmacéutica de TRCs comprende entre aproximadamente 8% y 54% de células CD90⁺ y entre aproximadamente 46% y 92% de células CD45⁺. La composición farmacéutica de TRCs preferentemente contiene entre aproximadamente 35×10^6 y 300×10^6 células nucleadas viables y entre aproximadamente 7×10^6 y 75×10^6 células CD90⁺ viables. La composición farmacéutica de TRCs preferentemente presenta menos de 0,5 EU/ml de endotoxina y ningún crecimiento bacteriano o fúngico. En realizaciones preferentes, una forma de dosificación de TRCs se encuentra comprendida dentro del intervalo de 4,7 a 7,3 ml de portador acuoso farmacéuticamente aceptable. La solución en suspensión preferente es solución para inyección de múltiples electrolitos de tipo 1 (USP/EP). Cada 100 ml de solución para inyección de múltiples electrolitos de tipo 1 contienen 234 mg de cloruro sódico, USP (NaCl), 128 mg de acetato potásico, USP ($C_2H_3KO_2$) y 32 mg de tetrahidrato de acetato de magnesio ($Mg(C_2H_3O_2)_2 \cdot 4H_2O$). No contiene agentes antimicrobianos. Se ajustó el pH con ácido hidroclicó. El pH era de 5,5 (4,0 a 8,0). La solución para inyección de múltiples electrolitos de tipo 1 preferentemente se suplementó con albúmina de suero humano al 0,5% (USP/EP). Preferentemente la composición farmacéutica de TRCs se almacenó a una temperatura de entre 0°C y 12°C, no congelada.

Indicaciones y modos de administración de las TRCs

Las TRCs pueden prepararse y procesarse para la administración en el paciente utilizando los procedimientos descritos, en los que la formulación final son las TRCs en la que se han eliminado sustancialmente todos los componentes de cultivo hasta niveles considerados seguros por la FDA. Resulta crítico para las células presentar una viabilidad final superior al 70%; sin embargo, cuanto más alta sea la viabilidad de la suspensión celular final, más potente y eficaz será la dosis celular final, y menor la cantidad de residuos celulares (membranas celulares, orgánulos y ácidos nucleicos libres procedentes de células muertas), de manera que los procedimientos que incrementan la viabilidad celular manteniendo simultáneamente niveles sustancialmente reducidos de componentes de cultivo y recolección, y en sistemas de procesamiento asépticos cerrados, resultan altamente deseables.

Isquemia de las extremidades

Se ha demostrado que las células derivadas de la médula ósea son utilizadas para la regeneración vascular en pacientes con isquemia crítica de las extremidades, enfermedad vascular periférica o síndrome de Burger. Las TRCs administradas en pacientes con extremidades isquémicas se ha demostrado que incrementan la regeneración vascular. Las TRCs se administran en el paciente mediante la creación de una suspensión celular y extrayendo las TRCs de la bolsa o vial en las que se administran. Se utiliza una jeringa para extraer la suspensión de TRCs, y después se cargan volúmenes individuales para inyección de menor tamaño, de 0,25 a 1 ml, desde la jeringa principal utilizando un adaptador para jeringas, y seguidamente se administran varios volúmenes individuales para inyección mediante inyección intramuscular en el sitio de la isquemia de las extremidades y en el sitio en el que se requiere la formación vascular. Las TRCs pueden administrarse mediante un amplio abanico de tamaños de aguja, desde agujas grandes de calibre 16 hasta agujas muy pequeñas de calibre 30, así como catéteres muy largos de calibre 28 para procedimientos mínimamente invasivos. Alternativamente, las TRCs también pueden administrarse intravascularmente y dejarse que se dirijan al sitio de isquemia para impulsar la regeneración local de tejido.

Regeneración cardiaca

Existe una diversidad de modos de administración para controlar la regeneración del tejido cardiaco. Las TRCs se administran intravascularmente y se deja que se dirijan al sitio de regeneración. Alternativamente, las TRCs también se administran directamente en el músculo cardiaco, epicárdica o endocárdicamente, así como transvascularmente. Las TRCs pueden administrarse durante un procedimiento de toracotomía abierta, o mediante procedimientos mínimamente invasivos tales como la administración mediante catéter. Las TRCs se administran en estos pacientes mediante la creación de una suspensión celular y extrayendo las TRCs de la bolsa o vial en las que se administran. Se utiliza una jeringa para extraer la suspensión de TRCs, y después se cargan volúmenes individuales para inyección de menor tamaño, de 0,25 a 1 ml, desde la jeringa principal utilizando un adaptador para jeringas, y seguidamente se administran varios volúmenes individuales para inyección mediante inyección intramuscular en el sitio de la isquemia cardiaca y en el sitio en el que se requiere la formación vascular. Las TRCs pueden administrarse mediante un amplio abanico de tamaños de aguja, desde agujas grandes de calibre 16 hasta agujas muy pequeñas de calibre 30, así como catéteres muy largos de calibre 28 para procedimientos mínimamente invasivos.

Regeneración de la médula espinal

Existe una diversidad de modos en los que se utilizan las TRCs para la regeneración tras la lesión de la médula espinal (SCI). Las TRCs pueden inyectarse directamente en el sitio de la SCI, sembrarse sobre una matriz (seleccionada de entre la lista proporcionada posteriormente, para la regeneración ósea) y sembrarse en la médula espinal reseca o introducirse inmediatamente en el sitio de manera que las TRCs podrían migrar hasta el sitio de la lesión. Alternativamente, las TRCs se administran intravascularmente y se deja que se dirijan al sitio de la lesión para impulsar la regeneración local de tejido.

Existe una diversidad de otras aplicaciones en las que pueden administrarse TRCs localmente en el tejido mediante inyección directa, siembra sobre una matriz para la administración localizada, o administrarse a través del sistema vascular, dejando que las TRCs se dirijan al sitio de la lesión o enfermedad. Estas enfermedades son la isquemia de las extremidades, la insuficiencia cardiaca congestiva, la isquemia cardiaca, la isquemia renal y la enfermedad renal de estadio final, el ictus y la isquemia ocular.

Indicaciones ortopédicas para las regeneraciones óseas

Las TRCs han sido utilizadas con éxito en aplicaciones de regeneración ósea en el ser humano. Opcionalmente, las TRCs se mezclan con matrices 3D para incrementar la administración y localización en el sitio en el que se requiere la regeneración ósea. Las matrices tridimensionales se presentan en un abanico de formas físicas y químicas, y también pueden añadirse materiales ligantes viscosos o gelificados para mejorar las propiedades de manipulación y administración.

65

Entre las matrices tridimensionales se incluyen, por ejemplo, partículas de hueso desmineralizado, partículas de hueso mineralizado, cerámica sintética de la familia del fosfato cálcico tal como fosfatos tricálcicos alfa (TCP), beta-TCP, hidroxiapatitos, y mezclas complejas de estos materiales. Entre otras matrices se incluyen, por ejemplo, esponjas basadas en el colágeno, materiales basados en polisacáridos tales como hialuronano y alginatos, materiales poliméricos biodegradables sintéticos tales como poliláctidos, poliglicólidos, polifumaratos, polietilenglicol, copolímeros de los mismos, así como otros materiales conocidos de la técnica.

Cualquiera de las matrices utilizadas con TRCs pueden procesarse en formas físicas diferentes que son comunes en la técnica de las aplicaciones de regeneración de tejidos. Dichas formas físicas son espumas y esponjas de poro abierto y cerrado, mallas de fibra tejidas o no tejidas o partículas de tamaño reducido, de nanopartículas a partículas de tamaño micrométrico (1 a 1.000 micrómetros) y macropartículas en la escala de tamaño de milímetros. Las partículas de tamaño reducido con frecuencia también presentan porosidad abierta, en donde los nanoporos ayudan al transporte de nutrientes y metabolitos, y los microporos proporcionan poros suficientemente grandes para facilitar la siembra celular y la integración en los tejidos.

En el caso de que las matrices utilizadas para la administración celular sean partículas pequeñas administradas en heridas, en ocasiones se utilizan materiales viscosos o geles para ligar las partículas que ayudan a la manipulación y administración de los materiales, así como a mantener las partículas y células localizadas en el sitio tras su introducción. Entre los materiales ligantes viscosos se incluyen, por ejemplo, hialuronano, alginatos, colágenos, polietilenglicoles, polifumaratos, coágulos sanguíneos y coágulos basados en fibrina, así como mezclas de dichos materiales, en forma de líquidos viscosos o de hidrogeles blandos o duros. Otros materiales viscosos e hidrogeles son conocidos de la técnica.

En diversas realizaciones, las TRCs se administran con TCP, hueso desmineralizado y partículas de hueso mineralizado en tamaños comprendidos entre 200 micrómetros y 5 milímetros, dependiendo de la aplicación específica. Opcionalmente, dichos materiales se ligan con coágulos de fibrina preparados a partir de plasma autólogo recién preparado procedente del paciente. También pueden utilizarse otros coágulos de fibrina o diferentes hidrogeles o materiales de matriz comunes.

Generalmente las TRCs se mezclan con las matrices inmediatamente antes de la cirugía en el caso de que se utilicen para la regeneración ósea. Para la regeneración de huesos largos, típicamente el cirujano abre el área de no unión ósea y extrae el hueso necrótico. El hueso o área no unida en la que se requiere hueso puede ser descortada o no por el cirujano para permitir el sangrado en el sitio, momento en el que el cirujano introduce la mezcla de TRC-matriz entre los huesos en los que debe producirse la regeneración. Esta mezcla de TRCs y matriz impulsa la regeneración de los tejidos, en la que la matriz física guía la localización de la regeneración ósea y las TRCs proporcionan el estímulo de reparación de los tejidos para impulsar la angiogénesis, la cicatrización de heridas y la regeneración ósea. La mezcla de TRCs/matriz restante se introduce opcionalmente en torno a la línea de fractura tras la introducción de cualquier dispositivo ortopédico tal como placas, espigas, tornillos o clavos.

40 **Métodos de producción de TRCs**

Se aíslan las TRCs a partir de cualquier tejido de mamífero que contenga células mononucleares de médula ósea (BM MNC). Las fuentes adecuadas para las BM MNC son sangre periférica, médula ósea, sangre de cordón umbilical e hígado fetal. Con frecuencia se utiliza sangre debido a que este tejido se obtiene fácilmente. Entre los mamíferos se incluye un ser humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, una vaca, un caballo o un cerdo.

El método de cultivo para generar TRCs se inicia con el enriquecimiento de BM MNC a partir del material de partida (por ejemplo tejido) mediante la extracción de glóbulos rojos y algunas de las células polinucleadas utilizando un método convencional de fraccionamiento celular. Por ejemplo, se fraccionan células mediante la utilización de una separación en gradiente de densidades FICOLL[®]. El volumen de material de partida necesario para el cultivo típicamente es reducido, por ejemplo de 40 a 50 ml, proporcionando una cantidad suficiente de células para iniciar el cultivo. Sin embargo, puede utilizarse cualquier volumen de material de partida.

A continuación, se evalúa la densidad de células nucleadas utilizando un contador celular automático, y la fracción enriquecida del material de partida se inocula en una cámara biológica (recipiente de cultivo celular). El número de células inoculado en la cámara biológica depende de su volumen. Los cultivos de TRCs que pueden utilizarse de acuerdo con la invención se llevan a cabo a densidades celulares de entre 10^4 y 10^9 células por ml de cultivo. En el caso de que se utilice una cámara biológica Aastrom Replicell, se inoculan $2-3 \times 10^8$ células en total en un volumen de aproximadamente 280 ml.

Antes de la inoculación, se prepara una cámara biológica con medio de cultivo. A título ilustrativo, el medio puede comprender tres componentes básicos. El primer componente es un componente de medio que comprende IMDM, MEM, DMEM, RPMI 1640, medio alfa o medio de McCoy, o un componente medio de cultivo conocido equivalente. El segundo es un componente suero que comprende por lo menos suero de caballo o suero humano y que

opcionalmente puede comprender además suero de feto bovino, suero bovino neonatal y/o suero bovino. Opcionalmente, pueden utilizarse medios de cultivo sin suero conocidos de la técnica. El tercer componente es un corticoesteroide tal como hidrocortisona, cortisona, dexametasona, solumedrol o una combinación de ellos, preferentemente hidrocortisona. En el caso de que se utilice una cámara biológica Aastrom Replicell, el medio de cultivo consiste de IMDM, suero fetal bovino aproximadamente al 10%, suero de caballo aproximadamente al 10%, hidrocortisona aproximadamente 5 mM y L-glutamina 4 mM. A continuación, las células y el medio se pasan a través de una cámara biológica en un programa de perfusión gradual controlado durante el procedimiento de cultivo. Las células se cultivan durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ó más días. Preferentemente las células se cultivan durante 12 días. Por ejemplo, al utilizarse con el casete celular Aastrom Replicell System, los cultivos se mantienen a 37°C con 5% de CO₂ y 20% de O₂.

Estos cultivos típicamente se llevan a cabo a un pH que es aproximadamente fisiológico, es decir 6,9 a 7,6. El medio se mantiene a una concentración de oxígeno que corresponde a una atmósfera oxigenada que contiene entre 1 y 20 por ciento en volumen de oxígeno, preferentemente 3 a 12 por ciento en volumen de oxígeno. El intervalo preferente de concentraciones de O₂ se refiere a la concentración de O₂ en proximidad a las células, no necesariamente en el punto de introducción de O₂, que puede encontrarse en la superficie del medio o a través de una membrana.

Los procedimientos estándares de cultivo requieren que el medio y el suero se intercambien semanalmente, en un solo intercambio realizado semanalmente o la realización dos veces por semana del intercambio de la mitad del medio y del suero. Preferentemente, el medio nutritivo del cultivo se sustituye, preferentemente perfundido, continua o periódicamente, a una tasa de aproximadamente 1 ml por ml de cultivo durante un periodo de entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas, para células cultivadas a una densidad de entre 2x10⁶ y 1x10⁷ células por ml. Para densidades celulares de entre 1x10⁴ y 2x10⁶ células por ml, puede utilizarse la misma tasa de intercambio de medios. De esta manera, para densidades celulares de aproximadamente 10⁷ células por ml, la presente tasa de sustitución de medios puede expresarse como 1 ml de medio por cada 10⁷ células por periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas. Para densidades celulares superiores a 10⁷ células por ml, la tasa de intercambio de medios puede incrementarse proporcionalmente para alcanzar un flujo constante de medio y suero por célula por unidad de tiempo.

Se describe un método para el cultivo de células de médula ósea en Lundell *et al.*, "Clinical Scale Expansion of Cryopreserved Small Volume Whole Bone Marrow Aspirates Produces Sufficient Cells for Clinical Use," J. Hematotherapy 8:115-127, 1999 (que se incorpora como referencia en la presente memoria). Se diluyeron los aspirados de médula ósea (BM) en solución salina tamponada isotónica (diluyente 2, Stephens Scientific, Riverdale, NJ) y se realizó un recuento de las células nucleadas utilizando un contador de células Coulter ZM (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Se lisaron los eritrocitos (no nucleados) mediante lisado manual (Stephens Scientific) y se separaron las células mononucleares (MNC) mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Paque[®] Plus, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) (gravedad específica: 1,077) a 300g durante 20 minutos a 25°C. Las BM MNC se lavaron dos veces con medio de cultivo de largo plazo para BM (LTBMC), que es medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con L-glutamina 4 mM (GIBCO BRL, Grand Island, NY), suero de feto bovino al 10% (FBS) (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), suero de caballo al 10% (GIBCO BRL), vancomicina 20 mg/ml (Vancocin[®] HCl, Lilly, Indianapolis, IN), gentamicina 5 mg/ml (Fujisawa USA, linc., Deerfield, IL) e hidrocortisona 5 mM (Solu-Cortef[®], Upjohn, Kalamazoo, MI) previamente al cultivo.

Almacenamiento de las células

Tras el cultivo, se recolectaron las células, por ejemplo utilizando tripsina, y se lavaron para eliminar el medio de crecimiento. Las células se resuspendieron en una solución de electrolitos de grado farmacéutico, por ejemplo Isolyte (B. Braun Medical Inc., Bethlehem, PA) suplementada con albúmina sérica. Alternativamente, las células se lavaron en la cámara biológica previamente a la recolección utilizando el procedimiento de lavado-recolección descrito posteriormente. Opcionalmente, tras la recolección se concentraron las células y se conservaron criogénicamente en recipientes biocompatibles tales como recipientes de congelación Cryocyte de 250 ml (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA) utilizando una solución madre crioprotectora que contenía DMSO al 10% (Cryoserv, Research Industries, Salt Lake City, UT), HSA al 10% (Michigan Department of Public Health, Lansing, MI) y 200 mg/ml de ADNasa humana recombinante (Pulmozyme[®], Genentech Inc., South San Francisco, CA) para inhibir la agregación celular durante la descongelación. El recipiente congelador Cryocyte se transfirió a un casete preenfriado y conservado criogénicamente con una congelación de tasa controlada (modelo 1010, Forma Scientific, Marietta, OH). Las células congeladas se transfirieron inmediatamente a un congelador de nitrógeno líquido (CMS-86, Forma Scientific) y se almacenaron en fase líquida. Los volúmenes preferentes para los cultivos concentrados se encuentra comprendidos entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 15 ml. Más preferentemente, las células se concentraron hasta un volumen de 7,5 ml.

Posterior cultivo

Tras la recolección de la cámara biológica, las células residían en una solución consistente de diversos componentes disueltos necesarios para soportar el cultivo de las células, así como componentes disueltos

producidos por las células durante el cultivo. Muchos de dichos componentes no son seguros o, de otro modo, inadecuados para la administración en el paciente. Para crear células listas para el uso terapéutico en el ser humano resulta necesario, por lo tanto, separar los componentes disueltos de las células mediante la sustitución de la solución de cultivo por una solución nueva que presente una composición deseada, tal como una solución de electrolitos inyectable de grado farmacéutico adecuada para el almacenamiento y la administración en el ser humano de las células en una aplicación de terapia celular.

Un problema significativo asociado a muchos procedimientos de separación es el daño celular causado por fuerzas mecánicas aplicadas durante estos procedimientos, que se manifiesta, por ejemplo, en una reducción de la viabilidad y la función biológica de las células y en un incremento del ADN celular libre y de los residuos. Además, puede producirse una pérdida significativa de células debido a la incapacidad de transferir todas las células al aparato de separación, así como de extraer todas las células del mismo.

Las estrategias de separación comúnmente se basan en la utilización de centrifugación o filtración. Un ejemplo de separación centrífuga es el procesador de células COBE 2991 (COBE BCT), y un ejemplo de una separación por filtración es el lavador de células CYTOMATE® (Baxter Corp.) (Tabla 7). Ambos son dispositivos de separación automática del estado de la técnica disponibles comercialmente que pueden utilizarse para separar (lavar) componentes de cultivo disueltos de las células recolectadas. Tal como puede observarse en la Tabla 7, dichos dispositivos resultan en una caída significativa de la viabilidad celular, una reducción del número total de células y en un cambio del perfil celular debido a la pérdida preferente de la gran y frágil subpoblación de CD14⁺auto⁺ de las TRCs.

Tabla 7. Rendimiento de 2 dispositivos de separación celular diferentes, 3 estudios diferentes.			
	Procesador celular COBE 2991 (n=3)	Lavador celular CYTOMATE (n=8)	Lavador celular CYTOMATE (n=26)
Principio de funcionamiento	Centrifugación	Filtración	Filtración
Estudio de referencia	Informe de protocolo interno de Aastrom n° PABI0043	Informe de nuevo desarrollo de procedimiento de lavado de Aastrom MF n° 0384	Ensayo clínico US de fractura BB-IND n° 10486
Viabilidad celular media pre-separación	93%	93%	95%
Viabilidad celular media post-separación	83%	71%	81%
Reducción media de la frecuencia de CD14Auto	18%	69%	No disponible
Recuperación celular media	73%	74%	No disponible

Dichas limitaciones de la técnica crean dificultades para implementar procedimientos de fabricación y producción para crear poblaciones celulares adecuadas para la utilización en el ser humano. Resulta deseable que el procedimiento de separación minimice el daño a las células y resulte de esta manera en una solución de células en la que se haya reducido la cantidad de componentes disueltos no deseados, manteniendo simultáneamente elevadas viabilidad y función biológica con una pérdida mínima de células. Además, resulta importante minimizar el riesgo de introducción de contaminantes microbianos que resulten en un producto final no seguro. Una menor manipulación y transferencia de las células reducirá inherentemente este riesgo.

Mediante la implementación de un procedimiento de separación para lavar las células, se minimiza la exposición de las células a fuerzas mecánicas y el atrapamiento de células que no pueden recuperarse. Como resultado, se minimiza el daño a las células (por ejemplo la viabilidad o función reducidas), la pérdida de células y el cambio del perfil celular, manteniendo todavía de manera efectiva la separación de componentes disueltos no deseados del cultivo. Preferentemente la separación se lleva a cabo en el mismo dispositivo en el que se cultivan las células, lo que elimina el riesgo añadido de contaminación por la transferencia y separación con otro aparato. El procedimiento de lavado se describe posteriormente.

Lavado-recolección

Al contrario que en procedimientos convencionales de cultivo, en los que las células se extraen (se recolectan) de la cámara biológica, seguido de la transferencia a otro aparato para separar (lavar) las células de los materiales de cultivo, la técnica de lavado-recolección invierte el orden y proporciona un medio único de completar todas las

etapas de separación (lavado) antes de la recolección de las células de la cámara biológica.

Para separar los materiales de cultivo de las células, puede introducirse un nuevo líquido (o gas) de composición deseada, preferentemente en el centro de la cámara biológica y preferentemente a un caudal controlado predeterminado. Esto resulta en el desplazamiento del líquido, que resulta expulsado a lo largo del perímetro de la cámara biológica, por ejemplo a través de las vías 48, y que puede recogerse en la bolsa de residuos 76.

El diámetro del espacio de líquido en la cámara biológica puede ser de aproximadamente 33 cm; la altura del espacio de líquido puede ser de aproximadamente 0,33 cm y los caudales de adición, enjuague y/o recolección de líquidos en la cámara biológica pueden ser de entre aproximadamente 0,03 y 1,0 intercambios de volumen (VE) por minuto, y preferentemente de entre 0,50 y aproximadamente 0,75 VE por minuto. Esto corresponde sustancialmente a un caudal de entre aproximadamente 8,5 y aproximadamente 280 ml/minuto, y preferentemente de entre 140 y aproximadamente 210 ml/minuto. Los caudales y velocidades, según algunas realizaciones, ayudan a garantizar que se retiene la mayoría de las células en cultivo en la cámara biológica y que no se pierden en la bolsa de residuos, y que no resulta necesario un periodo de tiempo excesivamente prolongado para completar el procedimiento. Generalmente el número de células en la cámara puede encontrarse comprendido entre 10^4 y 10^8 células/ml. Para las TRCs, la cantidad puede encontrarse comprendida entre 10^5 y 10^6 células/ml, correspondiente a un total de entre 30 y 300 millones de células para las dimensiones de la cámara biológica anteriormente indicadas. Evidentemente el experto en la materia entenderá que el número de células cambia al modificarse las dimensiones de la cámara biológica.

Al recolectar las células en cultivo de la cámara biológica, puede seguirse el procedimiento siguiente, que se indica de manera general en la Tabla 3, posteriormente. Las soluciones introducidas en la cámara biológica se añaden en el centro de la cámara biológica. La bolsa de medio residual 76 puede recoger el líquido correspondiente desplazado tras cada etapa en la que se introduce un líquido o gas en la cámara biológica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tras el cultivo de las células, se rellena la cámara biológica con medio de cultivo condicionado (por ejemplo IMDM, FBS al 10%, suero de caballo al 10%, metabolitos secretados por las células durante el cultivo) e incluye entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300 millones de células. A continuación puede introducirse una solución de NaCl al 0,9% ("solución de enjuague") en la cámara biológica a una tasa de entre aproximadamente 140 y 210 ml por minuto, hasta expulsar de la cámara biológica entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,0 litros de volumen total (Etapa 1).

Aunque un único intercambio de volumen para la introducción de un líquido nuevo o diferente en la cámara biológica reduce significativamente el líquido presente previamente dentro de la cámara biológica, quedará cierta cantidad del líquido previo. De acuerdo con lo anterior, los intercambios adicionales de volumen del líquido nuevo/diferente reducirán significativamente la cantidad del líquido previo.

Opcionalmente, en el caso de que las células de interés sean células adherentes, tales como TRCs, la solución de enjuague se sustituye por solución de recolección. Una solución de recolección es típicamente una solución de enzima que permite desenganchar las células adheridas a la superficie de cultivo. Entre las soluciones de cultivo se incluyen, por ejemplo, tripsina al 0,4%/EDTA en NaCl al 0,9% que puede introducirse en la cámara biológica a una tasa de entre aproximadamente 140 y 210 ml por minuto hasta administrar un volumen total de entre aproximadamente 400 y aproximadamente 550 ml (Etapa 2). Seguidamente, transcurre un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo 13 a 17 minutos) para permitir el desenganchado enzimático de las células adheridas a la superficie de cultivo de la cámara biológica (Etapa 3).

Puede introducirse Isolyte B (B Braun) suplementado con HSA al 0,5% a una tasa de entre aproximadamente 140 y 210 ml por minuto hasta la administración de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 litros de volumen total, para desplazar la solución de enzima (Etapa 4).

En este punto, se ha completado sustancialmente la separación de soluciones no deseadas (medio de cultivo, solución de enzima) de las células.

Para reducir el volumen recolectado, preferentemente se desplaza parte de la solución de Isolyte utilizando un gas (por ejemplo aire), que se introduce en la cámara biológica a un caudal dado a conocer (Etapa 5). Puede utilizarse para desplazar aproximadamente 200 a 250 cm³ del volumen actual de la cámara biológica.

A continuación, la cámara biológica puede agitarse para resuspender las células sedimentadas (Etapa 6). Seguidamente, dicha suspensión celular puede drenarse al interior de la bolsa de recolección celular 70 (u otro recipiente) (Etapa 7). Puede añadirse una cantidad adicional de la segunda solución a la cámara biológica y puede producirse una segunda agitación con el fin de enjuagar cualquier otra célula residual (Etapas 8 y 9). Este enjuague final seguidamente puede añadirse a la bolsa de recolección 70 (Etapa 10).

Tabla 8. Protocolo de lavado-recolección	
Número y nombre de etapa	Descripción
1	Expulsión mediante enjuague del medio de cultivo <i>Utilización de cloruro sódico para desplazar el medio de cultivo hacia el interior del recipiente de residuos</i>
2	Añadir solución de tripsina <i>Sustitución del cloruro sódico en la cámara de cultivo por solución de tripsina</i>
3	Incubación con tripsina <i>Incubación estática de 15 minutos en solución de tripsina</i>
4	Expulsión mediante enjuague de la solución de tripsina/transferencia a portador farmacéuticamente aceptable <i>Adición de Isolyte con HSA al 0,5% para desplazar la solución de tripsina hasta el interior del recipiente de residuos.</i>
5	Concentración/reducción de volumen <i>Desplazamiento de parte de la solución de Isolyte con aire para reducir el volumen final (etapa de concentración)</i>
6	Agitación de la cámara biológica <i>Movimiento de balanceo para desenganchar y suspender las células en la solución de Isolyte para su recolección</i>
7	Drenaje hacia el interior del recipiente de recolección <i>Drenaje de las células en solución de Isolyte hacia el interior de la bolsa de recolección de células</i>
8	Adición de solución de enjuague a la cámara biológica <i>Adición de más Isolyte para expulsar mediante enjuague las células residuales</i>
9	Agitación de la cámara biológica <i>Movimiento de balanceo para desenganchar y suspender las células en la solución de Isolyte para su recolección</i>
10	Drenaje hacia el interior del recipiente de recolección <i>Drenaje del enjuague final hacia el interior de la bolsa de recolección de células</i>

En comparación con las TRCs producidas utilizando un método convencional de lavado posterior al cultivo (por ejemplo CYTOMATE[®]), las TRCs producidas utilizando el procedimiento de lavado-recolección muestran una viabilidad posterior al lavado más alta y más consistente, una viabilidad posterior al almacenamiento más alta, un número total de células viables más alto, un número total de células CD90⁺ viables más alto, una cantidad ligeramente menor de BSA residual y una cantidad más alta y más consistente de CFU-F y CFU-GM por producto. La viabilidad posterior al lavado es más consistente con el nuevo procedimiento de lavado, con una desviación estándar de 2%, en comparación con 10% para el procedimiento de lavado CYTOMATE[®]. Las TRCs producidas utilizando el procedimiento de lavado-recolección también presentan un porcentaje más alto de células CD90⁺, lo que implica que el porcentaje de células estromales medulares es más alto en las TRCs, así como en las células CD14⁺, lo que significa que el porcentaje de células monocitos/macrófagos en las TRCs es más alto. La presencia de VEGFR1 también se encontraba incrementado en las TRCs del lavado-recolección. Aunque el número total final de células viables era más alto al utilizar el nuevo procedimiento de lavado, el nuevo producto de lavado contenía más agregados no disociados de células viables que deberían distinguirse de los agregados debidos a residuos, una fuente probable de agregados celulares de gran tamaño observados ocasionalmente en el producto del lavado CYTOMATE[®] tras 24 horas de almacenamiento. Dichos agregados no disociados aparentemente no interfieren con el almacenamiento o administración del producto celular.

Métodos de separación

5 El procedimiento de lavado-recolección descrito anteriormente también resulta útil para la separación de soluciones con componentes disueltos de las partículas contenidas dentro de la solución. El procedimiento de lavado-recolección se basa en la inesperada capacidad de generar un flujo controlado de solución sobre las partículas sedimentadas sobre una superficie horizontal, de manera que las partículas no resultan desplazadas por el flujo, y la solución de efluente se recoge libre de partículas.

10 El procedimiento utiliza, por ejemplo, una cámara cilíndrica delgada con su diámetro orientado horizontalmente y con una altura que es suficientemente reducida para que una solución introducida en una cámara vacía la rellene verticalmente sin fluir horizontalmente. El diámetro de la cámara es suficientemente grande para alojar la cantidad de partículas que debe separarse y típicamente es muchas veces la altura de la cámara.

15 Típicamente, la cámara presenta una altura de aproximadamente 0,4 cm, correspondiente a la altura deseada para la utilización de la cámara en el cultivo de células, aunque puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1,0 cm (o más). El diámetro de la cámara puede ser de aproximadamente 33 cm, aunque también puede incluir un intervalo de entre aproximadamente 10 cm y aproximadamente 50 cm (o más). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un volumen de cámara preferible puede ser de aproximadamente 280 cm³, aunque este volumen (evidentemente) corresponde a intervalos de diámetros y alturas de la cámara.

20 Antes de iniciar el procedimiento de separación, el volumen de la cámara se rellena por completo con una primera solución que contiene partículas. Las partículas son de densidad más alta que la solución y se sedimentan por gravedad o se adhieren a la superficie circular del fondo de la cámara. La altura apilada total de las partículas en la cámara, que puede minimizarse mediante la distribución uniforme de las partículas en la superficie del fondo, es una fracción reducida de la altura total de la cámara. Para llevar a cabo la separación, se introduce una segunda solución de una nueva composición deseada en el centro de la cámara a un caudal controlado y la solución fluye simétricamente hacia el perímetro de la cámara, desplazando la primera solución en la cámara que fluye hacia el exterior de la cámara en el perímetro y resulta dirigida a un punto de recolección común. Como resultado de la geometría, la velocidad lineal del flujo se reduce proporcionalmente a la distancia al centro, de manera que la velocidad lineal es mínima donde sale del perímetro de la cámara. El caudal preferentemente se encuentra controlado, de manera que la velocidad lineal es suficientemente baja para evitar el movimiento hacia el exterior de la cámara de partículas sedimentadas, y sólo se extrae líquido de la misma. La altura relativamente reducida de la cámara biológica tal como se describe en la presente memoria preferentemente permite un flujo con efecto tapón en la dirección radial que minimiza la mezcla de la solución desplazada con la solución nueva. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, esto permite desplazar un porcentaje alto de la primera solución con una segunda solución de la cámara biológica. Pueden llevarse a cabo uno o más intercambios adicionales de volumen con la segunda solución para reducir adicionalmente los niveles residuales de la primera solución dentro de la cámara.

40 A modo de modo alternativo de funcionamiento previo a la extracción de las partículas de la cámara, la primera solución también puede ser desplazada por un gas, tal como aire, que se introduce en el centro de la cámara y con el mismo intervalo de caudales indicado para la introducción de una segunda solución. Lo anterior resulta en una reducción controlada del volumen de líquido dentro de la cámara, aunque todavía reteniendo las partículas. A continuación, puede introducirse una solución de enjuague de un volumen menor que la cámara a modo de portador para desplazar y recoger las partículas de la cámara en un volumen reducido de solución.

45 Puede utilizarse como líquido de intercambio una diversidad de soluciones que son compatibles con las partículas contenidas, por ejemplo para células: cualquier medio de cultivo, cualquier tampón fisiológico, cualquier inyectable de grado farmacéutico.

50 Puede utilizarse cualquier solución de enzima utilizada convencionalmente para el cultivo celular para desenganchar y recolectar las células adheridas. Se sustituye el medio de cultivo que contiene células adheridas, por un tampón que contiene el enzima. Se exponen las células al enzima durante un periodo de tiempo de manera que las células adherentes ya no sean adherentes. A continuación, se sustituye el tampón enzimático por otro líquido en el que las células se almacenarán o se utilizarán. A continuación, se somete la cámara a agitación para provocar la suspensión de las células en el líquido, y éste se recoge en un recipiente biocompatible. Por ejemplo, el líquido puede ser un crioprotector para el almacenamiento a -80°C, o un portador farmacéuticamente aceptable para la administración en el paciente. Entre las soluciones de enzima para la recolección celular se incluyen tripsinas (de origen animal, microbiano, o recombinantes), diversas colagenasas, enzimas de origen microbiano alternativos, agentes de disociación, proteasas generales o mezclas de los mismos. Se proporciona una lista de algunas soluciones de enzima de recolección comerciales a continuación:

60

Reactivo	Fabricante	Descripción
Reactivo de recolección Replicell [®] de Aastrom	Invitrogen	Tripsina de origen porcino
TrypLe [™]	Invitrogen	Enzima recombinante derivado de la fermentación microbiana
Solución TrypZean [™]	Sigma	Tripsina bovina recombinante expresada en maíz
HyQTase [™]	HyClone	Enzimas proteolíticos y colagenolíticos
Acutasa	Innovative Cell Technologies, Inc.	Enzimas proteolíticos y colagenolíticos
Solución Accumax	Innovative Cell Technologies, Inc.	Enzimas proteolíticos y colagenolíticos más agentes de dispersión celular
Tripsina recombinante/EDTA	Cascade Biologics	Tripsina bovina recombinante

Sistema biorreactor

5 El sistema biorreactor dado a conocer en la patente US nº 6.048.721 (patente '721) puede utilizarse para producir la composición según algunas realizaciones de la invención. Se proporciona a continuación una parte de dicha exposición.

10 Tal como se muestra en la figura 1, un sistema biorreactor incluye un casete celular desechable 100 en el que tiene lugar el crecimiento y expansión de las células, una unidad incubadora 200 y hardware adjunto, un controlador de sistema 300 que controla el ambiente biológico y físico durante el proceso de expansión, y una unidad procesadora 400 que facilita por lo menos uno de entre el rellenado, procesamiento e inoculación de las células, así como la recolección final de las células tras completarse el proceso de expansión.

15 La simulación de la médula ósea con el propósito del crecimiento y expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas generalmente requiere, entre otros elementos, una concentración uniforme de oxígeno y un suministro uniforme de un líquido perfusor portador de nutrientes para todas las células en cultivo. Una función primaria del casete celular 100 es proporcionar un ambiente estéril cerrado que permita la oxigenación y la perfusión de medio de la cámara biológica que contiene.

20 Con referencia a la figura 5, el elemento primario del casete celular es una cámara de cultivo biorreactora de tipo discoidal 10 ("cámara biológica") que presenta una periferia exterior preferentemente circular. La cámara biológica puede formarse con cuatro componentes principales: una parte superior 20, una base 30, un disco de lecho celular 40 y una membrana impermeable a los líquidos y permeable a los gases 50.

25 Tal como se muestra esquemáticamente en la figura 7, la parte superior 20 de la cámara biológica se fija a la base 30 (preferentemente de un modo hermético a los líquidos), por ejemplo mediante la aplicación de energía localizada para soldar entre sí los dos trozos (u otro medio de fijación tal como una pluralidad de tornillos), en su periferia radialmente exterior. La membrana 50 se fija entre la parte superior y la base y se estira firmemente de manera que separe el volumen interior de la cámara biológica en partes superior e inferior.

30 El disco de lecho celular 40 se encuentra situado dentro de la parte inferior del interior de la cámara biológica. Generalmente presenta una forma de disco con un labio anular 42 que extiende hacia arriba situado en su periferia radial exterior. Tras la inoculación de las células de partida, se produce el crecimiento celular en un lecho de crecimiento celular 25 definido entre la superficie superior del disco 40, la superficie inferior de la membrana 50 y el labio anular 42. La superficie superior A del labio anular 42 preferentemente es coplanar con la superficie superior de la pestaña 30 A de la base 30 en el caso de que el disco 40 se encuentre ajustado en la base, de manera que la membrana 50 puede cooperar con el labio 42 sellando el lecho de crecimiento celular 25.

35 El disco 40 del lecho celular presenta una abertura radialmente central 44 de suministro de medio de crecimiento, que se extiende hacia abajo a través de la base 30 hasta el exterior de la cámara biológica. Alternativamente, la abertura de suministro de medio de crecimiento puede localizarse en un punto radialmente céntrico sobre el disco 40 de lecho celular y extenderse hacia arriba a través de la abertura central elevada 28 hasta el exterior de la cámara biológica (no mostrado). También presenta por lo menos una vía de recolección 46 (también puede incluir una pluralidad de vías de recolección) en proximidad al límite radialmente exterior del lecho celular, es decir, inmediatamente en el interior del labio 42. La vía 46 también se extiende a través de la base hasta el exterior de la cámara biológica. Alternativamente, pueden localizarse una o más vías de recolección en proximidad al límite

radialmente exterior de la base, es decir, inmediatamente en el interior del perímetro del lecho celular y extenderse directamente desde la base hasta el exterior de la cámara biológica (no mostrado). Finalmente, una pluralidad de, por ejemplo, 24, aberturas de descarga de medio residual 48, se encuentran localizadas en el perímetro del disco 40, permitiendo la comunicación fluida entre el compartimiento de lecho celular establecido en la parte superior del disco y el compartimiento de residuos establecido en la parte inferior del disco. Las aberturas 48 preferentemente se espacian uniformemente en torno a la periferia radialmente exterior del disco 40, en posiciones inmediatamente contiguas al labio 42.

Se suministra un medio de crecimiento rico en nutrientes a la abertura de suministro de medio 44. El medio de crecimiento puede ser un medio de crecimiento estándar, tal como es bien conocido de la técnica, y puede presentar un suplemento de suero tal como suero de feto bovino, suero de caballo o suero humano. También puede encontrarse libre de suero. También pueden añadirse factores de crecimiento y reactivos tales como glutamina según resulte necesario. El medio de crecimiento puede suministrarse en bolsas premezcladas o puede modificarse *in situ*.

Desde la abertura de suministro de medio, el medio de crecimiento entra en el lecho celular 25 y fluye radialmente hacia afuera hacia la periferia radial del disco 40. A medida que fluye, suministra nutrientes a las células que se cultivan en el disco, y elimina productos residuales de las mismas. Se descarga en forma de medio residual del lecho celular mediante flujo a través de la pluralidad de aberturas 48, tal como muestran las flechas en la figura 7.

Debido al flujo radialmente hacia afuera del líquido perfusor y la disposición de las aberturas de salida 48, las células en el lecho de cultivo celular se perfunden uniformemente con nutrientes. Por ejemplo, el flujo radial del líquido perfusor a una pluralidad de aberturas de salida espaciadas equiangularmente promueve un flujo uniforme de líquido desde la entrada y sobre el lecho celular hasta las localizaciones de salida perimetrales en la circunferencia del lecho celular.

La base 30 presenta aberturas 32 y 34 a través de las cuales las vías 44 y 46 pueden extenderse de un modo hermético a los líquidos, por ejemplo mediante sellos (no mostrados) entre las aberturas y las vías. Alternativamente, las aberturas no resultan necesarias en el caso de que la vía 44 se extienda hacia arriba a través de la vía central 28 y la vía 46 se extienda directamente desde la base (no mostrada). La base también incluye generalmente una vía de salida situada centralmente 36 para el líquido residual desplazado desde la cámara biológica. El líquido residual de las aberturas 48 fluye radialmente hacia el interior, a través del espacio entre la superficie inferior del disco 40 y la superficie superior de la base 30, hasta la vía 36 y de esta manera se descarga de la cámara biológica. La vía 36 puede ser coaxial, aunque también puede encontrarse ligeramente desplazada respecto al centro radial de la base 30 con el fin de incluir la abertura 32 para la vía de introducción de medio 44. Alternativamente, la abertura no resulta necesaria en el caso de que la vía 44 se extienda hacia arriba a través de la vía central 28 (no mostrada).

La parte superior de la cámara biológica 20 se fija a la base 30 de un modo hermético a los líquidos, con la membrana 50 entre ellas, tal como se ha indicado anteriormente. Puede incluirse un camino laberíntico concéntrico de costillas que se extienda hacia el interior desde la parte superior 20 para soportar la membrana 50 frente a la distorsión debida a la presión fluida del líquido de perfusión en el lecho celular. Las costillas 22 mantienen un espaciado preciso entre la superficie superior del disco 40 y la superficie inferior de la membrana 50, es decir, un grosor exacto para el lecho de crecimiento celular. Este grosor puede ser de aproximadamente 4 mm con el fin de garantizar una oxigenación adecuada de las células en el lecho de crecimiento celular. Alternativamente, puede utilizarse una serie de soportes periódicos que se extiendan hacia abajo desde la parte superior 20 y un disco poroso delgado al que se lamina la membrana 40 para mantener la posición de la membrana, proporcionando un grosor exacto para el lecho de crecimiento celular (no mostrado).

Las costillas 22 también forman una cámara de gas de tipo laberíntico a través de la cual puede fluir un líquido de oxigenación, tal como aire, para suministrar oxígeno que se difunde a través de la membrana y hacia el interior del lecho celular. Los dos extremos del laberinto pueden ser contiguos de manera que el aire oxigenante pueda suministrarse a la vía de introducción de gas 24 y descargarse a través de la vía de salida de gas 26. Alternativamente, en el caso de que se hayan utilizado soportes periódicos en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, las vías de introducción y de salida de gas pueden localizarse próximas al perímetro de la parte superior en posiciones enfrentadas a 180° de manera que el aire oxigenante pueda suministrarse a la vía de introducción de gas y descargarse por la abertura de salida de gas (no mostrada).

Se forma una vía central elevada en forma de campana 28 en un centro radial de la parte superior 20 y forma una cámara sellada por la costilla anular 29 apoyada contra la membrana. Las células pueden inocularse en la cámara de crecimiento celular a través de un septo de vía central 28A. Para ello, puede fijarse un septo no de látex para agujas a una vía utilizando una banda hermética al aire para acceder directamente al área en el que residen las células. Alternativamente, una línea de tubos puede extenderse desde la vía central que pueden conectarse a un recipiente externo de células utilizando un soldador estéril de tubos (no mostrado).

Con referencia a las ilustraciones detallada de la parte superior, base y disco de lecho celular de la cámara biológica

en las figuras 8 a 10, la parte superior 20 de la cámara biológica se muestra en las figuras 8A y 8B. La parte superior 20 preferentemente se forma de un plástico no reactivo transparente moldeado por inyección, tal como poliestireno o PETG. Generalmente presenta una parte principal de tipo discoidal 20A unida en su periferia radialmente exterior por una pestaña 20B. La pestaña 20B presenta una pluralidad uniformemente espaciada de orificios para tornillo 20C, a través de los cuales pueden pasar tornillos (no mostrados) para fijar la parte superior 20 a la base 30. Alternativamente, puede utilizarse una soldadura EMA (electromagnética) para fijar la parte superior a la base (no mostrado).

La vía central elevada 28 presenta un forma generalmente de campana y una membrana central 28A. El septo es una barrera impermeable a gases y líquidos que puede ser perforada con una aguja de inyección y que es autosellante al retirarla. Alternativamente, una línea de tubos puede extenderse desde la vía central que pueden conectarse a un recipiente externo utilizando un soldador estéril de tubos (no mostrado). Una pluralidad uniformemente espaciada de costillas radiales de refuerzo 20D se extiende desde la parte principal 20A entre la vía central 28 y una costilla anular de refuerzo 20E contigua al borde 20B.

Las costillas 22 generalmente se encuentran orientadas anularmente y forman un laberinto 20F, tal como muestran las líneas discontinuas en la figura 8A. El laberinto puede espiralizarse de manera que un gas oxigenante pueda fluir a través de una cámara de gas que se define de esta manera sobre la totalidad del lecho de crecimiento celular. Los extremos opuestos del laberinto preferentemente son contiguos entre sí en el extremo radialmente externo de la parte principal 20A. Una vía de introducción 24 y una vía de salida 26 se comunican con los extremos opuestos del laberinto. Alternativamente, en el caso de que se hayan utilizado soportes periódicos en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, las vías de introducción y salida de gas pueden localizarse próximas al perímetro de la parte superior, opuestas entre sí en 180°, de manera que el aire oxigenante pueda ser suministrado a la vía de introducción de gas y descargarse a través de la vía de salida de gas (no mostrado).

Una de las costillas radialmente más interiores 29 puede ser un anillo continuo que, en cooperación con la membrana 50, selle la cámara de gas definida por el laberinto desde el interior de la vía central 28. Una de las costillas continuas radialmente más externas 20F define el límite más exterior del laberinto. Las puntas de la totalidad de las costillas 20F, 22 y 29 son coplanares con la superficie del fondo de la pestaña 20B, de manera que las costillas se sellan contra la membrana 50 al ensamblarse la cámara biológica. Alternativamente, en el caso de que se hayan utilizado soportes periódicos en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, las puntas de la totalidad de los soportes son coplanarse con la superficie del fondo de la pestaña 20B, de manera que la posición de la membrana 50 se encuentra controlada (no mostrado).

Con referencia a las figuras 9A y 9B, el disco del lecho celular 40 preferentemente también se forma de un plástico no reactivo transparente moldeado por inyección, tal como poliestireno o PETG. Presenta generalmente una parte principal de tipo discoidal 40A limitada en su periferia radialmente externa por el labio anular 42. La superficie superior de la parte principal generalmente es lisa y sin obstrucciones, y forma una superficie de adhesión para la colonia celular en cultivo.

Con referencia a las figuras 10A y 10B, la base 30 preferentemente también se forma de un plástico no reactivo transparente moldeado por inyección, tal como poliestireno o PETG. También presenta una parte principal de tipo discoidal 30A limitada por una pestaña periférica elevada 30A que presenta una superficie superior 30B y orificios para tornillos 30C. Alternativamente, los orificios para tornillos se sustituyen por elementos para llevar a cabo una soldadura EMA para fijar la base a la parte superior (no mostrado). Tras el ensamblado, el disco 40 encaja completamente dentro de los límites de la pestaña periférica 30A, siendo la superficie A estrechamente contigua y coplanar respecto a la superficie 30B. Un labio periférico 30D se extiende hacia arriba desde el borde radialmente externo de la pestaña 30B situando y reteniendo la membrana 50 durante el ensamblado de la cámara biológica.

La superficie superior de la parte principal 30A presenta una pluralidad de regiones elevadas 30E que soportan la superficie del fondo del disco 40 y mantienen una separación entre el disco 30 y la base 30, definiendo de esta manera el camino de fluido para el flujo de retorno del medio residual hasta la vía de salida central 34. Los huecos 30F y 30G circundan cada una de las aberturas 32 y 34 y pueden alojar elementos resilientes para el sellado de las aberturas. Alternativamente, las aberturas no resultan necesarias en el caso de que la vía 44 se extienda hacia arriba a través de la vía central 28 y la vía 46 se extienda directamente desde la base (no mostrada).

Una pluralidad de costillas radiales de soporte 30H se extienden desde la superficie inferior de la base y se extienden entre las costillas anulares de soporte 30I y 30J. Los ensanchamientos anulares de refuerzo 30K, 30L y 30M circundan las aberturas 32, 34 y 36, respectivamente.

Durante el ensamblado de la cámara biológica, se sitúan sellos apropiados en las aberturas 32 y 34, y se sitúa el disco 40 dentro de la base 30 con los adaptadores de las vías 44 y 46 extendiéndose de forma hermética a través de las aberturas respectivas, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 7. Alternativamente, las aberturas y sellos relacionados no resultan necesarios en el caso de que la vía 44 se extienda hacia arriba a través de la vía central 28 y la vía 46 se extienda directamente desde la base (no mostrado). A continuación, se coloca la membrana

- 50 sobre el disco 40 y la pestaña 30A, y se sujeta dentro del labio 30D. Alternativamente, la membrana 50 se lamina contra un disco poroso, proporcionando estabilidad mecánica adicional antes de la colocación sobre el disco 40 (no mostrado). A continuación, la parte superior 20 se coloca sobre la base alineando los orificos para tornillo 20C y 30C, y se pasan los tornillos a través de los orificos para tornillo y se aprietan para unificar la cámara biológica.
- 5 Alternativamente, se utiliza una soldadura EMA para unir la parte superior y la base (no mostrado). En este momento, la costilla anular externa 20F fijará la membrana 50 contra la parte radialmente más interna de la superficie 30B, sellando el interior de la cámara biológica.
- 10 Con referencia a las figuras esquemáticas 5 y 6, la cámara biológica 10 se sujeta dentro de una cubierta de un casete celular 100 y forma una unidad desechable preensamblada. La cámara biológica se fija a una base de casete 60 de la cubierta del casete. En el sistema ilustrado, la base 60 presenta una pestaña de soporte 62 con una abertura central que presenta una pluralidad de orificios. Los tornillos utilizados para fijar la parte superior a la base de la cámara biológica 10 también pueden extenderse a través de dichos orificios para la fijación de la cámara biológica a la base del casete 60. Alternativamente, pueden montarse sujeciones de montaje en la base para la
- 15 fijación de la cámara biológica a la base en 3 ó más posiciones perimetrales uniformemente espaciadas (no mostradas). La base del casete se encuentra cerrada en su parte superior por una tapa 64 y en su parte inferior por una bandeja 66, y se monta un recipiente de suministro de medio 68 en una superficie frontal de la base del casete 60 para suministrar un medio de crecimiento a la cámara biológica. El recipiente de suministro de medio 68 se proporciona con una línea de suministro de medio 68A conectada a la vía de introducción de medio 44 de la cámara biológica. Se suministra aire presurizado desde una bomba de aire al espacio de aire en la parte superior del medio en el recipiente de suministro de medio a través de la línea 68B, y de esta manera se presuriza el medio de crecimiento de manera que proporcione una tasa de flujo constante de medio al lecho de crecimiento celular 25 en la cámara biológica. Se suministra medio de crecimiento adicional al recipiente a través del conducto de suministro 68C del recipiente de medio.
- 20 Puede conectarse una bolsa de recolección de células 70 (u otro dispositivo de recolección de células) a la vía de recolección 46 de la cámara biológica mediante el conducto 72 y la válvula de recolección 74.
- 25 Una bolsa de líquido residual 76 se sitúa en la parte inferior de la cámara biológica, descansando sobre la bandeja 66 del casete celular. Recibe líquido residual procedente de la cámara biológica mediante un dispositivo de cámara de goteo 78 conectado a una placa de válvulas 80 en la parte posterior del casete celular. La cámara de goteo incluye un sifón para permitir el mantenimiento de una presión baja controlada con precisión dentro de la cámara biológica. Puede dotarse al dispositivo de cámara de goteo de un contador de gotas (no mostrado). Realice un recuento de las gotas de líquido residual con el fin de detectar el caudal.
- 30 El líquido residual alcanza el dispositivo de cámara de goteo a través de una válvula de residuos 82. Se utiliza la presión de gas en la vía central 28 de la cámara biológica para regular el flujo a través de la cámara de goteo, mediante la válvula de la abertura central 84 y la línea 84A.
- 35 También puede conectarse a la placa de válvulas una vía de suministro de la bomba de aire 86 para suministrar aire comprimido a una presión constante al recipiente de suministro de medio mediante la línea de suministro de la bomba de aire 68B, vías de introducción y salida de gas 88 y 90 para suministrar gas oxigenante fresco a la cámara biológica y descargar el gas oxigenante agotado de la cámara biológica, una válvula de suministro de medio 92 conectada a la línea de suministro 68A del recipiente de medio, la válvula de HBSS 94 y la válvula de tripsina 96.
- 40 Alternativamente, la válvula 94 y la válvula 96 se sustituyen por una sola válvula para la adición de un abanico de reactivos, tales como HBSS y tripsina (no mostrados).
- 45 Cada casete también puede incluir una "llave" que contiene un dispositivo de memoria no volátil y un reloj. Antes de la utilización, la llave del casete se inicializa con datos de rastreo, comandos de protocolo y el tiempo real mediante el controlador del sistema 300. La electrónica del sistema utiliza la llave durante el procedimiento de producción celular para registrar los datos pertinentes, así como para acceder a los comandos de protocolo.
- 50 Durante la utilización, un casete celular desechable estéril de un solo uso 100 se suministra en un paquete protector. Incluye el reservorio de suministro de medio 68, control de flujo de medio (no mostrado), la cámara biológica 10, el reservorio de residuos 76, el reservorio de recolección 70, una llave y los tubos, válvulas y empaquetamiento necesarios para interconectar y dar soporte a los componentes. Alternativamente, el reservorio de recolección puede proporcionarse en forma de un componente separado y después conectarse al casete en el momento de la recolección utilizando un soldador estéril de tubos.
- 55 Durante el funcionamiento, la clave en primer lugar es inicializada por el controlador del sistema. Tras inicializar la llave, se transfiere al procesador 400. El procesador incluye un girador multieje ("*modulador*") 410. El modulador incluye una mesa de apoyo 412 sobre la que puede fijarse el casete. El modulador presenta conexiones mecánicas 414 para el giro de la mesa de soporte respecto a dos ejes horizontales ortogonales.
- 60 Tras cargar un casete celular en el procesador 400 y fijarlo a la mesa de soporte 410, e indicar la llave que resulta
- 65

necesaria la inoculación, el procesador proporciona una secuencia automática de operaciones de inoculación. Por ejemplo, la secuencia de inoculación puede consistir de las etapas siguientes. En primer lugar, se lleva la mesa moduladora 412 a una posición horizontal de partida. A continuación, se ceba el casete celular 100 con medio de crecimiento hasta el volumen requerido mediante la alimentación por gravedad del medio desde el reservorio 68. Alternativamente, puede aplicarse presión al reservorio para facilitar la transferencia de medio. Durante este tiempo, la válvula de recolección 74 se encuentra cerrada y la válvula de residuos 82 se encuentra abierta, de manera que el medio en la cámara biológica 25 puede fluir a través de las aberturas 48 pero no a través de la vía de recolección 46. A continuación, se inclina el casete celular para generar una burbuja que se utilizará para distribuir las células. Seguidamente se inocular la cámara biológica con células. Esto puede llevarse a cabo pasando una jeringa hipodérmica a través del septo de la vía central y la membrana. Alternativamente, puede conectarse un recipiente con células a una línea de tubo que se extiende desde la vía central utilizando un soldador estéril de tubos y después inocular las células utilizando gravedad o presión (no mostrado). A continuación, el modulador hace oscilar el casete celular (es decir, agita el contenido en el mismo) siguiendo un programa predeterminado para distribuir las células sobre la superficie superior del disco 40. En este momento la burbuja ayuda a distribuir uniformemente las células dentro de la cámara biológica. A continuación se purga el aire remanente a través de la vía central y se saca el casete del procesador. El casete ahora se encuentra listo para la incubación.

La cámara biológica 10 puede llenarse sustancialmente (preferentemente llenarse por completo) con el medio de crecimiento, que puede ser desplazado por células durante la inoculación. Por ejemplo, la cámara biológica puede llenarse hasta un volumen total de aproximadamente 80% con el medio de crecimiento. Las células, durante la inoculación, pueden suspenderse en el mismo medio de crecimiento, o en un líquido/medio diferente. Durante la inoculación, la cámara biológica puede llenarse hasta un nivel inferior al máximo (por ejemplo 90% del volumen total), de manera que las células puedan distribuirse uniformemente en la totalidad del interior de la cámara biológica durante la agitación. Tras la inoculación, preferentemente, la cámara biológica se encuentra sustancialmente llena (preferentemente llena por completo).

A continuación, se introduce el casete en el incubador 200, en el que se mantiene la cámara biológica en una posición horizontal para permitir que las células sedimenten por gravedad sobre la superficie inferior de la cámara biológica, donde permanecen durante el cultivo. El incubador es un instrumento capaz de aceptar casetes celulares para la producción celular. Puede presentar la forma de una rejilla 210 a la que se fija una pluralidad de casetes. Se acopla al casete, proporcionando un control sobre el ambiente de cultivo en el interior del casete. También se conecta al controlador del sistema 300 y a la llave para almacenar el tiempo y fecha de inicio de la incubación en la llave, y se proporcionan continuamente datos de la incubación a la llave durante la secuencia de incubación. La llave también recibe información sobre sucesos anormales tales como alarmas o fallos de corriente eléctrica, la cantidad de medio utilizada y la identificación del incubador. El incubador controla el flujo de medio a través de la cámara de crecimiento, la temperatura del reservorio de medio de crecimiento 68 y la concentración y caudal de gases administrados a la cámara de gas en la cámara biológica, basados en los parámetros de control almacenados en la llave. El incubador también realiza un seguimiento de diversos parámetros de seguridad/alarma para garantizar que el procedimiento de producción celular funciona según lo esperado. Lo anterior puede llevarse a cabo para varios incubadores mediante el ordenador-controlador del sistema o mediante la utilización de un ordenador del incubador independiente.

Tras completarse el cultivo, se saca el casete del incubador y se devuelve al procesador, en donde se lleva a cabo el procedimiento de lavado-recolección anteriormente indicado.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

EJEMPLOS

50 **Ejemplo 1. Protocolos de cultivo de células de reparación de tejidos (TRCs) y de técnica de lavado.** *Cultivo de TRCs*

Las células mononucleares frescas de médula ósea (BM MNC) aisladas mediante FICOLL[®] de la sangre de donantes normales se obtuvieron de Poietics Inc. (Gaithersburg, MD). Alternativamente, se recibió médula ósea (BM) aspirada en forma de un espécimen clínico procedente de pacientes y se separó en FICOLL[®] para crear una preparación de células mononucleares. Se evaluó la densidad celular utilizando un contador celular automático y se cultivaron las BM MNC mediante el método de Lundell *et al.* indicado anteriormente. Antes de la inoculación se cebaron las cámaras de cultivo con medio de cultivo consistente de IMDM, suero de feto bovino al 10%, suero de caballo al 10%, hidrocortisona 5 mM y L-glutamina 4 mM. Se pasó medio a través de las cámaras de cultivo en un programa de perfusión gradual controlado durante el procedimiento de cultivo de 12 días. Se mantuvieron los cultivos a 37°C con 5% de CO₂ y 20% de O₂.

Método de lavado CYTOMATE[®]

65 CYTOMATE[®] es un sistema totalmente automático diseñado para el lavado y la concentración de productos de

glóbulos blancos. Incluye un instrumento electromecánico y conjuntos desechables preesterilizados de un solo uso que proporcionan un circuito de lavado para cada lote de células que debe procesarse. Incorpora tecnología de membranas giratorias que proporciona un efecto de flujo tangencial para evitar la carga excesiva del filtro con células.

5

Diseño

1. Carga del circuito de lavado en el instrumento CYTOMATE®

10 2. Conexión de bolsas:

-Bolsa de células recolectadas del procedimiento de cultivo (TRCs en 800 a 1.000 ml de volumen de líquidos del procedimiento de cultivo, por ejemplo medio de cultivo, solución de enzima de recolección).

15 -Solución de tampón (2.000 a 3.000 ml, Isolyte suplementado con HSA al 0,5%).

-Bolsa de recolección para las células lavadas (120 a 180 ml de volumen recolectado).

-Bolsa de sobrenadante (2.600 a 3.900 ml de líquido residual no recolectado con las células).

20

Procedimiento CYTOMATE®

1) Cebado del circuito de lavado con solución de tampón e inicio de la recirculación,

25 2) Transferencia de células de la bolsa de recolección al circuito de lavado, reducción del volumen de líquido mediante la recirculación de las células por el circuito de lavado, eliminando líquido simultáneamente a través del filtro en el circuito de lavado (el filtro es giratorio, proporcionando un efecto de flujo tangencial que evita la obstrucción del filtro). El líquido eliminado se recoge en la bolsa de sobrenadante.

30 3) Utilización de tampón para enjuagar las células residuales de la bolsa de recolección hasta el circuito de lavado.

4) Lavado de las células mediante la recirculación de las mismas por el circuito de lavado, eliminando simultáneamente líquido a través del filtro giratorio a la bolsa de sobrenadante y añadiendo solución de tampón según resulte necesario para mantener el volumen.

35

5) Transferencia de las células lavadas a la bolsa de recolección.

6) Utilización de tampón para enjuagar las células residuales del circuito de lavado hasta la bolsa de recolección.

40 *Método de lavado-recolección*

El procedimiento de lavado-recolección se inicia desplazando el medio de cultivo de una cámara de cultivo con una solución de enjuague biocompatible (Etapa 1, Tabla 8, anteriormente). La solución de enjuague (solución salina normal u otra solución isotónica) seguidamente se sustituye por una solución de enzima de recolección celular (Etapa 2, Tabla 8), utilizando la tripsina porcina la mayor parte del tiempo. También se han utilizado con éxito otros reactivos de recolección no derivados de animales, tales como TRYPLE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) y TRYPZEAN™ (Sigma, St. Louis, MO). Se deja incubando la cámara de cultivo durante un periodo de tiempo (5 a 60 minutos, preferentemente 15 minutos, con tripsina porcina), mientras el enzima trabaja disociando las células unas de otras y desenganchándolas de la superficie de cultivo (Etapa 3, Tabla 8). Tras completar la incubación con enzima, una segunda solución de enjuague (Isolyte o Normasol), típicamente de grado inyectable, desplaza la solución de enzima (Etapa 4, Tabla 8). En este punto, la cámara contiene las células desenganchadas, que quedan sedimentadas sobre la superficie celular, y se suspende en una solución de grado inyectable. Con el fin de incrementar la densidad celular recolectada final y reducir el volumen final, se desplaza con aire una parte de esta solución de enjuague (Etapa 5, Tabla 8). Tras alcanzar el volumen final de líquido (100 a 350 ml) en la cámara de cultivo, se agita la cámara con el fin de resuspender las células sedimentadas (Etapa 6, Tabla 8). Esta suspensión celular se drena en un recipiente de recolección celular (Etapa 7, Tabla 8). Puede añadirse una cantidad adicional de la solución de grado inyectable a la cámara de cultivo celular y producirse una segunda agitación con el fin de expulsar mediante enjuague células residuales en caso necesario (Etapas 8 y 9, Tabla 8). Este enjuague final seguidamente se añade al recipiente de recolección celular (Etapa 10, Tabla 8).

60

Comparación entre los procedimientos Cytomate y de lavado-recolección

El día de la recolección se dividieron las TRCs en dos cultivos. El primer cultivo se recolectó y se concentró

mediante un procedimiento CYTOMATE[®] estándar. Las TRCs en el primer cultivo se recolectaron mediante tripsinización (tripsina al 0,025% en cloruro sódico al 0,9%) y se lavaron para reducir la cantidad de materiales de cultivo utilizando un procesador celular CYTOMATE[®] (Baxter International, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lavó el producto de células con una solución de electrolitos de grado farmacéutico suplementada con HSA al 0,5% en un volumen de 150 ml y se utilizó, sin modificación, o concentrada hasta volúmenes de 15 ó 5 ml en una bolsa biocompatible. El segundo cultivo de TRCs se recolectó utilizando una versión de la secuencia de procesamiento combinado de lavado-recolección ARS y un procedimiento modificado de concentración diseñado para reducir adicionalmente los residuos con una etapa adicional de dilución.

Para crear una suspensión concentrada de TRCs, las células recolectadas de cada lavado se centrifugaron hasta un volumen de 20 ml y se transfirieron a una bolsa de menor tamaño, tal como una bolsa Cryocyte. Tras introducirse en el recipiente final, se lleva a cabo una segunda etapa de centrifugación para la concentración hasta un volumen final de entre 4,7 y 20 ml, creando una dosis de células comprendida entre 35 y 300 millones de células en 6 ml \pm 1,3 ml, pero hasta 20 ml de solución de grado inyectable, dependiendo de la aplicación final.

Ejemplo 2. El procedimiento de lavado-recolección incrementó la calidad de las TRCs respecto al lavado CYTOMATE[®]

Las TRCs aisladas mediante lavado-recolección presentaban una viabilidad celular mayor, un rendimiento celular mayor, menos BSA residual, un número total más alto de células progenitoras, de células madre, de células inmunológicas y de marcadores de células endoteliales, una capacidad incrementada de formar colonias, una viabilidad comparable tras el pase por aguja, niveles más altos de citoquinas antiinflamatorias y niveles más altos de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Estas mejoras de la población de TRCs debidas a la utilización del nuevo procedimiento de lavado-recolección permiten utilizar la población a modo de agente terapéutico más efectivo para la reparación de tejidos en comparación con los procedimientos del estado actual de la técnica.

Materiales y métodos

Recuento/viabilidad celulares

Se evaluó el número y viabilidad celulares utilizando un Nucleocounter o mediante exclusión de azul tripán. Se utilizó el protocolo del fabricante para el recuento celular utilizando el Nucleocounter. Brevemente, se diluyó la suspensión celular hasta una densidad de entre 100.000 y 10.000.000 células/ml, y se aspiró la suspensión celular en un NucleoCassette. Se introdujo el nucleocassette en el Nucleocounter para la tinción automática con yoduro de propidio, incluyendo el recuento y viabilidad celulares. En los casos en que no se disponía de datos de Nucleocounter, se utilizó la exclusión de azul tripán y el hemocitómetro (recuento manual) para estimar el número y viabilidad de las células. Durante el curso de los análisis de 27 muestras, los recuentos celulares de Nucleocounter se encontraban dentro de 13% de los recuentos según la técnica del azul tripán y la viabilidad se encontraba dentro del 4%.

Durante estos experimentos, el muestreo de producto en las etapas de procesamiento posteriores al cultivo varió dependiendo de los ensayos y de otros usos para las células. Se utilizó la estrategia siguiente para obtener el número total más exacto de las células viables a partir de los datos. Se calculó el número total de células de cada muestra y el número obtenido se multiplicó por la viabilidad de la siguiente etapa de procesamiento y seguidamente se sumó al recuento de células viables en esa etapa. Por ejemplo, en el caso de que se extrajera una muestra de 10×10^6 células totales del producto lavado y la viabilidad de las células tras la concentración fuese de 80%, se añadían 8×10^6 células viables al recuento total de viables del producto concentrado, representando lo que se habría encontrado presente en el caso de no haber realizado el muestreo no estándar. Tras calcular los totales no muestreados, se restó el volumen de muestra producido real de 29 ml del número total de células de cada producto lavado.

Niveles residuales

Se utilizó el sobrenadante del procedimiento final de concentración de TRCs de cada experimento para medir el nivel de BSA residual (mediante ELISA) y la actividad trípica (mediante el ensayo QuantiCleave). Se utilizó un ensayo ELISA BSA para medir y comparar los niveles de BSA residual del medio de cultivo.

Protocolo de concentración

Para crear una suspensión concentrada, las células recolectadas se centrifugan hasta un volumen de 20 ml y se transfieren a una bolsa de menor tamaño, tal como una bolsa Cryocyte. Tras introducirse en el recipiente final, se lleva a cabo una segunda etapa de centrifugación para la concentración hasta un volumen final de entre 4,7 y 20ml, creando una dosis de células comprendida entre 35 y 300 millones de células en 6 ml \pm 1,3 ml, pero hasta 20 ml de solución de grado inyectable, dependiendo de la aplicación final. Los volúmenes preferentes para los cultivos concentrados con 6 ml \pm 1,3 ml. Tras retirar las TRCs del almacenamiento, se descongelan los cultivos en un baño

de agua circulante a 37°C.

Viabilidad celular y % de CD90⁺

5 Se midió la viabilidad celular y el % de células CD90⁺ mediante citometría de flujo. Las células se lavaron y se resuspendieron en 1X solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS, Gibco) que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Los tubos que contenían 10⁶ células en 0,5 ml se tiñeron sobre hielo con diversas combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentemente. Se determinó la viabilidad con 7-amino-actinomicina D (7AAD) (Beckman Coulter). La 7AAD sólo entra en las células con membranas comprometidas y se une al ADN. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD90 (Thy1) conjugados con PC5 y anti-CD14 conjugados con FITC (Beckman Coulter). Tras 15 minutos, se lavaron las células y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS/BSA para el análisis en el citómetro de flujo Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

Análisis de citoquinas intracelulares mediante citometría de flujo

15 La expresión de citoquinas por las TRCs producidas utilizando el procedimiento de lavado-recolección se determinó cuantitativamente mediante análisis de citometría de flujo intracelular de 2 colores. Brevemente, se incubaron las TRCs durante la noche o sin lipopolisacárido bacteriano (LPS) en presencia de brefeldina A para incrementar la acumulación intracelular de citoquinas en el aparato de Golgi, bloqueando simultáneamente la secreción de citoquinas. Las TRCs se tiñeron para marcadores de superficie celular mediante incubación con anticuerpos monoclonales (mAbs) conjugados con FITC o Cy5PE (mAbs anti-CD14, CD66b, CD90 ó de control). Se definió la subpoblación de linfocitos mediante separación según tamaño celular basado en la dispersión lumínica directa (FSC) y granularidad basada en la dispersión lumínica en ángulo recto (90°) (SSC). A continuación, las células se fijaron utilizando paraformaldehído y se permeabilizaron en saponina antes de teñirlas con anticuerpos monoclonales conjugados con PE específicos de citoquina (IL-6, IL-10, IL-12 ó control irrelevante), tal como se indica en la columna izquierda de la Tabla 4. Los datos para el análisis de 2 colores se obtuvieron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FC500.

Análisis de frecuencias de CFU

30 Para los ensayos de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), se sembraron placas de cultivo tratadas de tejido de 35 mm con células en 1 ml de LTBMC. Para las TRCs, se sembraron 500 y 1.000 células en cada placa. Los cultivos se mantuvieron durante 8 días a 37°C en una atmósfera totalmente humidificada de 5% de CO₂ en aire. A continuación, se tiñeron las colonias de CFU-F con tinción de Wright-Giemsa y se realizó un recuento de las colonias con más de 20 células, que se consideraron CFU-F.

40 Para los ensayos de unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (CFU-GM), se inocularon células en medio de ensayo de colonias que contenía metilcelulosa al 0,9% (Sigma), FBS al 30%, BSA al 1%, 2-mercaptoetanol 100 mM (Sigma), L-glutamina 2 mM (Gibco), PIXY321 5 ng/ml, G-CSF 5 ng/ml (Amgen) y 10 U/ml de Epo. Las TRCs se sembraron en placa a razón de 1.500 y 3.000 células por ml. Los cultivos se mantuvieron durante 14 días y las colonias con más de 50 células se contaron como CFU-GM.

Administración de células mediante agujas

45 Para someter a ensayo los efectos de la administración mediante aguja sobre los recuentos y viabilidad de las células TRC, se analizaron muestras de cinco de los productos de lavado-recolección y tres de los productos de lavado CYTOMATE[®]. Estos experimentos de administración analizaban la capacidad de las células almacenadas de ser administradas en pacientes sin perder viabilidad o concentración tras el pase a través de agujas de calibre 25.

50 Tras 24 horas de almacenamiento a 4°C, se extrajeron del frigorífico bolsas Cryocite que contenían TRCs y se masajearon para resuspender y homogeneizar las TRCs para el muestreo. Se recogieron dos muestras de 0,5 ml con una jeringa de 3 ml y se introdujeron en tubos etiquetados "TRC". A continuación, se introdujeron dos jeringas adicionales de 3 ml en la válvula de paso de 3 vías y se extrajeron 0,5 ml adicionales de cada jeringa. A continuación, se enroscaron agujas de calibre veinticinco (1 pulgada y media, BD) sobre dichas 2 jeringas adicionales (de 3 ml) y se denominaron "TRC, calibre 25, aguja de 1 pulgada y media". A continuación, se midieron las muestras de TRC restantes y se registró el volumen. En estas jeringas de 3 ml se añadieron agujas de calibre 25 (1 pulgada y media) a dos de las jeringas, y se añadieron agujas de calibre 25 (3 pulgadas, aguja espinal) a dos otras jeringas. Las muestras enteras de 0,5 ml de las agujas en las jeringas de 3 ml con agujas se dispensaron utilizando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA) a una tasa de 2,5 ml por minuto o de 0,5 ml en 12 segundos en tubos de poliestireno de fondo redondo. Tras la administración de las células por las agujas, se evaluaron todas las muestras para su recuento celular utilizando el Nucleocounter.

Análisis de la expresiónIDO

65 Las TRCs expresan un enzima inmunorregulador inducible denominado indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) que se

asocia a la regulación negativa de las respuestas inflamatorias. Se derivaron células de reparación de tejido (TRCs) utilizando el nuevo procedimiento de lavado-recolección descrito en la presente invención. Tras la recolección, las TRCs se incubaron durante 24 horas en medio solo o en medio que contenía 1.000 unidades/ml de interferón- γ humano recombinante (IFN- γ). Los extractos de proteínas procedentes de lisados celulares totales se separaron en un gel de SDS al 10%-poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y se sondearon utilizando un anticuerpo monoclonal específico de ratón anti-IDO humana. Se utilizó un anticuerpo de segunda etapa de cabra antirratón conjugado con peroxidasa de rábano picante para la visualización posterior mediante quimioluminiscencia. Este experimento demuestra una banda característica de 44 kilodaltons (kd) que corresponde específicamente a la expresión de proteína IDO por parte de TRCs tras la inducción con IFN- γ .

Resultados

Recuento de células viables totales

La figura 11 muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente un número más alto de células viables totales tras el lavado que al utilizar el lavado CYTOMATE[®], tras restar la muestra de fabricación, de 29 ml. Los datos resumidos en la figura 11 son de 9 producciones que comparan el lavado CYTOMATE[®] con el lavado de hibridación del mismo donante. Se utilizó reactivo de recolección de Aastrom (tripsina porcina) en la totalidad de dichas nueve producciones. El rendimiento medio de células viables totales posterior al lavado para el lavado CYTOMATE[®] fue de $66,5 \times 10^6 \pm 36,8 \times 10^6$ células viables, mientras que el rendimiento medio de células viables totales posterior al lavado para el lavado de hibridación fue de $144 \times 10^6 \pm 50,9 \times 10^6$ células viables. La variabilidad del rendimiento total aparentemente es dependiente del donante.

Viabilidad

La figura 11 también muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente una viabilidad celular posterior al lavado más alta que al utilizar el lavado CYTOMATE[®]. Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células aisladas de los mismos 9 donantes indicados anteriormente. El producto de lavado-recolección mostraba una viabilidad más consistente, con una desviación estándar de 2%, en comparación con la desviación estándar de la viabilidad del lavado CYTOMATE, de 10%.

Recuento y viabilidad tras el almacenamiento durante 24 horas

La figura 11 también muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente una viabilidad celular más alta, incluso tras 24 horas de almacenamiento a 4°C, que al utilizar el lavado CYTOMATE[®]. Se midió el porcentaje de viabilidad tras 24 horas de almacenamiento a 4°C de células procedentes de 5 donantes.

Concentración en BSA posterior al lavado

La figura 11 también muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo concentraciones más bajas del BSA residual del cultivo de las TRCs que el dejado al utilizar el lavado CYTOMATE[®]. Resultan necesarios niveles bajos de BSA para generar un producto farmacéutico apropiado para la administración en el ser humano.

Viabilidad celular y % de CD90⁺ según la citometría de flujo

La figura 11 muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente porcentajes más altos de TRCs CD90⁺ que al utilizar el lavado CYTOMATE[®] en células no concentradas. Las células CD90⁺ representan células estromales de la médula ósea que presentan propiedades de células madre/progenitoras y que resultan útiles para reparar diversos tipos de tejido.

La figura 12 muestra que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente un número total más alto de TRCs CD90⁺ que al utilizar el lavado CYTOMATE[®]. El número medio total de células CD90⁺ viables en el producto final de lavado-recolección fue de $42,4 \times 10^6 \pm 16,5 \times 10^6$. El número medio total de células CD90⁺ viables en el producto final de lavado-recolección fue de $19,4 \times 10^6 \pm 16,5 \times 10^6$.

% de CD14⁺ Auto⁺

La figura 12 y 13 muestran que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetiblemente porcentajes y números totales más altos de TRCs CD14⁺ Auto⁺ que al utilizar el lavado CYTOMATE[®]. El número total medio de células CD14⁺ Auto⁺ viables en el producto concentrado de nuevo lavado en dichos seis donantes era de $34,8 \times 10^6 \pm 9,08 \times 10^6$. El número total medio de células CD14⁺ Auto⁺ en el producto concentrado de lavado CYTOMATE[®] en dichos seis donantes era de $16,5 \times 10^6 \pm 5,37 \times 10^6$.

% de VEGFR1⁺

Las figuras 12 y 13 muestran que el procedimiento de lavado-recolección produjo repetidamente números totales y porcentajes más altos de TRCs VEGFR1⁺ al utilizar el lavado CYTOMATE[®] en células concentradas, demostrando la presencia de un mayor número de células endoteliales en la mezcla final. En cada uno de los cinco experimentos en los que se midió, se observaron más células VEGF-R1⁺ viables en el producto de lavado-recolección que en el control de CYTOMATE[®]. El número medio total de células VEGF R1⁺ viables en el producto concentrado de lavado CYTOMATE[®] en dichos cinco donantes fue de $16,5 \times 10^6 \pm 5,37 \times 10^6$.

10 Frecuencia de CFU-Fs

Las figuras 12 y 14 muestran que el procedimiento de lavado-recolección produjo frecuencias comparables de CFU-Fs a las del lavado CYTOMATE[®]. La media de la proporción de frecuencias de CFU-F era de 1,03.

15 Las figuras 13 y 15 muestran que el procedimiento de lavado-recolección produjo un mayor número de CFU-F por dosis que el lavado CYTOMATE[®]. El número total de CFU-Fs por dosis se calculó mediante multiplicación de la frecuencia de CFU-Fs por célula por el recuento total de células viables posteriormente al lavado. Las CFU-Fs medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado en dichos 8 experimentos fue de $7,26 \times 10^5 \pm 5,22 \times 10^6$. Las CFU-Fs medias por dosis para el procedimiento de lavado CYTOMATE[®] en dichos 8 experimentos fue de $3,01 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$.

20 Frecuencia de CFU-GMs

Las figuras 12 y 16 muestran que el procedimiento de lavado-recolección en prácticamente todos los casos produjo una frecuencia igual o superior de CFU-GMs por dosis que el lavado CYTOMATE[®]. La media de la proporción de frecuencias de CFU-GM era de 1,37.

Las figuras 13 y 17 muestran que el procedimiento de lavado-recolección produjo en prácticamente todos los casos un número total mayor de CFU-GMs por dosis que el lavado CYTOMATE[®]. El número total de CFU-GMs por dosis se calculó mediante multiplicación de la frecuencia de CFU-GMs por célula por el recuento total de células viables posteriormente al lavado. Las CFU-GMs medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado en dichos 6 experimentos fue de $0,42 \times 10^6 \pm 0,19 \times 10^6$. Las CFU-GMs medias por dosis para el procedimiento de lavado CYTOMATE[®] en dichos 6 experimentos fue de $0,17 \times 10^6 \pm 0,11 \times 10^6$.

35 Administración mediante aguja

La figura 17 muestra que la viabilidad celular del producto del procedimiento de lavado-recolección no muestra un cambio sustancial tras la administración por agujas de calibres 25 y 30. La figura 18 muestra datos similares para los productos lavados mediante CYTOMATE[®].

Se sometieron a ensayo las CDF-Fs en células posteriores a la administración mediante aguja del experimento QTRC107000021. La figura 19 muestra las CFU-Fs por cada 100 células para las tres condiciones. Las TRCs del procedimiento de lavado-recolección presentaban una viabilidad ligeramente más alta que las TRCs del lavado CYTOMATE[®].

Estos datos demuestran la comparabilidad entre los procedimientos respecto a la capacidad de administrar las células mediante agujas al final del procesamiento sin perder sustancialmente viabilidad celular tras el tránsito a través de agujas de calibre pequeño.

50 Secreción de citoquinas

El perfil de secreción de citoquinas por parte de las TRCs del lavado CYTOMATE[®] es comparable por célula para prácticamente la totalidad de las citoquinas evaluadas para el procedimiento de lavado-recolección. Sin embargo, por dosis unitaria (procediendo todas las células del procedimiento), la secreción total de citoquinas por dosis era generalmente más alta en el procedimiento de lavado-recolección (figura 20); de esta manera, en forma de composición concentrada, la población celular es mucho más funcional que la población anterior.

Tabla 9. Análisis citométrico del flujo TRCs y subpoblaciones-TRC para la expresión intracelular de citoquina.												
	TRCs		SUBPOBLACIONES DE TRCs									
	-	+	CD14+Auto+		CD14+Auto-		CD66b+		CD90+		Linfocitos	
LPS:	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Control:	0.	0.										
	4	3										
IL-6:	11	15	6,2	9,2	0,9	1,2	0,6	0,7	1,6	1,1	1,1	1,3
IL-10:	6.	7.	2,8	4,5	0,4	0,6	0,5	0,4	0,9	0,6	0,1	0,1
	4	9										
IL-12:	0.	0.	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	0	0										

Se llevó a cabo un análisis intracelular de citometría de flujo para evaluar la frecuencia de las células productoras de IL-6, IL-10 e IL-12 de las TRCs producidas utilizando el procedimiento de lavado-recolección. En la Tabla 9 se muestra el porcentaje medio de células positivas para citoquinas para N=2 experimentos. Estas observaciones demuestran que una frecuencia significativa (6% a 15%) de las TRCs produjo IL-6 ó IL-10. En contraste, la producción intracelular de IL-12 por parte de las TRCs o de las subpoblaciones de TRCs no era detectable por encima de los niveles de fondo de tinción observados para los anticuerpos de control irrelevantes. La IL-12 no era detectable por encima de los niveles de fondo con independencia de la estimulación con mediadores inflamatorios tales como el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Globalmente, estos datos son altamente consistentes con los perfiles de secreción de citoquinas definidos por los análisis de Luminex y ELISA de sobrenadantes de TRCs (figura 20), que demuestran una elevada secreción de múltiples citoquinas angiogénicas e inmunomoduladoras en ausencia completa de IL-12 detectable, un mediador proinflamatorio clave.

15 Expresión deIDO

La indolamina-2,3-dioxigenasa, o IDO, es un enzima inmunorregulador. Las TRCs producen niveles más altos de ARNm de IDO en respuesta a la exposición a IFN γ (figura 24). Las TRCs también producen cantidades más altas de proteína IDO en respuesta a la exposición a IFN γ (figura 25).

20 Expresión de PDL1

Las TRCs expresan niveles altos de PD-L1 en respuesta a la inducción inflamatoria (figura 31). Se incubaron TRCs sin (no inducidas) o con (inducidas) 1.000 unidades por ml de interferón- γ durante 24 horas antes de la tinción con isotipo de control conjugado con fluorocromo, o anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 para el análisis de citometría de flujo. Estas observaciones demuestran que las TRCs regulan positivamente la PD-L1 (incremento >75% de la expresión), un receptor inhibitorio clave implicado en la regulación negativa de respuestas inmunológicas e inflamatorias.

30 Resumen

El procedimiento de lavado-recolección crea un producto celular más sano ($p < 0,05$) en cada etapa (posterior al lavado, posterior a la concentración y tras 24 horas de almacenamiento), así como una menor cantidad de proteínas séricas residuales ($p < 0,05$) en comparación con el lavado CYTOMATE[®] (figura 11). No existen diferencias estadísticas en los porcentajes de células CD90⁺, CD14⁺ auto⁺ o VEGFR1⁺ o en las capacidades de formación de colonias F o GM. Por lo tanto, el producto celular es de perfil comparable, aunque mucho más sano y puro.

Tabla 10. Estadísticas para la figura 11.							
	Proporción nuevo/Cytomate de donantes apareados	Stdev	Actual	stdev	nuevo	stdev	Valor de p<0,05
% de viabilidad tras el lavado (n=9)	1,32	0,19	71,6%	9,7%	92,8%	2,2%	X
% de viabilidad tras la concentración (n=9)	1,24	0,11	73,7%	6,2%	91,2%	3,7%	X
% de viabilidad tras 24 horas de almacenamiento (n=5)	1,32	0,33	66,8%	14,2%	84,5%	3,8%	X
% de CD90 ⁺ en el producto final (n=7)	1,07	0,20	28,8%	13,9%	30,1%	13,4%	
% de CD90 ⁺ en el producto final (n=7)	1,24	0,10	26,0%	6,6%	31,7%	6,4%	
% de VEGFR1 ⁺ en el producto final (n=5)	1,24	0,21	32,2%	10,7%	38,5%	8,6%	
Frecuencia de CFU-F, producto final (n=3)	0,95	0,25	7,12	3,60	7,07	4,17	
Frecuencia de CFU-GM, producto final (n=3)	1,43	0,65	0,22	0,12	0,27	0,10	
BSA residual, µg/ml (n=11)	0,61	0,27	2,65	0,76	1,51	0,56	X

Respecto al número total de células en el producto final (la dosis final que resulta del procedimiento), se observa un número estadísticamente superior de células viables totales, células CD90⁺ viables totales y CD14⁺auto⁺ (dos células que secretan citoquinas inmunomoduladoras).

5

Tabla 11. Estadísticas para la figura 12.							
	Proporción nuevo/Cyto mate de donantes apareados	Stdev	Actual (media)	stdev	Nuevo (media)	stdev	Valor de p<0,05
Células viables totales tras el lavado (n=9)	1,91	0,72	95,0E+6	47,5E+6	161,1E+6	57,3E+6	X
Producto final de células viables totales finales producto (n=9)	2,42	1,17	58,3E+6	32,2E+6	113,9E+6	38,6E+6	X
Células viables totales CD90 ⁺ en producto final (n=7)	1,98	0,49	18,8E+6	8,9E+6	34,6E+6	10,5E+6	X
Células viables totales CD14 ^{auto} ⁺ en producto final (n=6)	2,16	0,40	20,4E+6	5,4E+6	43,2E+6	11,7x10 ⁶	X
Células viables totales VegfR1 ⁺ en producto final (n=5)	2,12	0,40	26,0E+6	13,1E+6	53,9E+6	26,4E+6	
CFU-F por dosis, producto (n=3)	1,71	0,68	5,8E+6	3,8E+6	8,9E+6	4,1E+6	
CFU-GM por dosis, producto final (n=3)	2,64	1,46					

El procedimiento de lavado-recolección produjo TRCs con una viabilidad más alta y niveles residuales menores a partir del cultivo celular. Ello permitió recolectar un mayor número de TRCs de cada cultivo.

5

Además, el procedimiento de lavado-recolección produjo TRCs con porcentajes incrementados de células CD90⁺, CD14⁺Auto⁺ y VEGFR1⁺ en comparación con las TRCs aisladas utilizando el lavado CYTOMATE[®]. Además, el procedimiento de lavado-recolección produjo TRCs que secretaban más citoquinas antiinflamatorias previamente a la dosis de células, incluyendo IL-1ra, IL-10 e IL-6 y proteínas con efectos antiinflamatorias tales como IDO y PDL1. Además, las TRCs no expresan citoquinas proinflamatorias clave como IL-12. Esto demuestra que las TRCs aisladas mediante el método de lavado-recolección presentan un potencial de reparación de tejidos y antiinflamatorio más alto debido al porcentaje más alto de células estromales de la médula ósea, células endoteliales y células monocíticas/macrófagos.

10

Además, la técnica de lavado-recolección produjo consistentemente un número más alto de CFUs que la técnica de lavado CYTOMATE[®]. Esto demuestra que las TRCs producidas mediante la técnica de lavado-recolección presentan un número mayor de células progenitoras y de células madre que las TRCs producidas mediante la técnica de lavado CYTOMATE[®].

15

Además, el procedimiento de lavado-recolección produjo TRCs que no perdían sustancialmente viabilidad al pasarlas por una aguja de calibre 25 ó 30, lo que podría resultar necesario para la administración terapéutica. Las TRCs del procedimiento de lavado-recolección presentaron un rendimiento aproximadamente igual, o ligeramente

20

mejor que las TRCs producidas utilizando el lavado CYTOMATE®.

Ejemplo 3. Potencial incrementado de reparación ósea de las TRCs del procedimiento de lavado-recolección basado en un número incrementado de células CD90⁺

5 El potencial formador de hueso u osteogénico de las células mononucleares de la médula ósea no expandidas (BM MNC) y de las TRCs se evaluó utilizando un ensayo de diferenciación ósea *in vitro*. Brevemente, las TRCs aisladas mediante el procedimiento de lavado-recolección se cultivaron durante un máximo de 3 semanas en placas de 35 mm que contenían medio de control (OS⁻) (DMEM con FBS al 10%) o medio osteogénico (OS⁺) (DMEM que contenía FBS al 10%, dexametasona 100 nM, β-glicerofosfato 10 mM y L-ascorbato-2-fosfato 0,05 mM) a una densidad de entre 10.000 y 20.000 células por cm². Se evaluó la diferenciación osteogénica a partir de la morfología celular, la expresión de fosfatasa alcalina (AP) y la formación de una matriz mineralizada por deposición del calcio. La actividad de AP presente en el cultivo diferenciado se cuantificó utilizando el kit AttoPhos (Promega), una conversión enzimáticamente catalizada de la forma fosfato del sustrato de AttoPhos en BBT, y medición de la absorbancia a 435 nm y a 555 nm. Se expresó la actividad enzimática como unidades de actividad de AP. Se cuantificó el calcio siguiendo el procedimiento proporcionado en el kit cuantitativo del calcio (Pointe Scientific Inc., Canton, MI). Brevemente, se lisaron cultivos osteogénicos con HCl 0,5 N y los lisados se recogieron en tubos de microcentrifuga. Tras agitar con vórtex, cada muestra se agitó a 500 rpm durante 4 horas a 4°C. Tras la centrifugación a 1.000xg en una microcentrifuga, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para la presencia de calcio mediante la medición de la absorbancia a 570 nm.

En experimentos separados, se separaron las células CD90⁺ de los productos TRC utilizando Epics Altra (Beckman Coulter) y se sembraron en placa para identificar el potencial osteogénico tal como se ha indicado anteriormente. Se presenta la deposición media de calcio ± SEM de tres experimentos para cada población celular.

25 Se midió la frecuencia de células CD90, células CD15 y el potencial osteogénico *in vitro* para las TRCs obtenidas de CYTOMATE®, del procedimiento de lavado-recolección según la invención y de células madre mesenquimales (MSCs) procedentes del mismo donante de médula ósea. Las MSCs se cultivaron en medio DMEM con FBS al 10%. Resulta importante que el cultivo de MSCs incluye la eliminación de células accesorias no adherentes poco antes del inicio del cultivo, y el posterior cultivo y pase de la población adherente al plástico. A continuación, se cultivaron las MSCs y TRCs en medio inductivo osteogénico durante un máximo de 3 semanas (en todos los casos un número equivalente de días en cada experimento). Se cuantificó la deposición de calcio y la actividad de fosfatasa alcalina. En este estudio, los presentes inventores evaluaron el potencial osteogénico de las MSCs primarias y de primer pase en comparación con las TRCs.

35 Los estudios anteriores con las TRCs de CYTOMATE® han demostrado que: 1) el potencial osteogénico de las TRCs es mucho mayor que el de las BM MNCs, y 2) el potencial osteogénico de las TRCs reside en la fracción CD90⁺ de las células (Tabla 12).

40 **Tabla 12. Potencial osteogénico en médula ósea no expandida y expandida**

Población celular	Cantidad media de calcio depositada (µg/placa)
BM MNC	1,094 ± 893
TRC	17,943 ± 2,864
CD90 ⁺	7,260 ± 2,118
CD90 ⁻	13 ± 11

45 Las TRCs del CYTOMATE y del lavado-recolección según la técnica de la invención seguidamente se compararon directamente para el potencial osteogénico. Mediante la medición de la deposición del calcio, los resultados demuestran que, de media, el potencial osteogénico era 2 veces más alto con la dosis de TRCs de lavado-recolección (Tabla 13, figura 21).

Tabla 13. El potencial osteogénico por dosis unitaria es mayor con el nuevo procedimiento de lavado-recolección

Expt. nº	CYTOMATE	Nuevo lavado-recolección	Proporción nuevo:Cytomate
OTRC107000094	6,57E+06	1,51 E+07	2,30
QTRC107000095	3,45E+06	5,62E+06	1,63
QTRC107000096	2,07E+07	5,13E+07	2,48
OTRC107000097	1,90E+07	3,00E+07	1,58
QTRC107000098	6,15E+06	1,43E+07	2,33
Media=	1,12E+07	2,33E+07	2,06 ± 0,42

50 El potencial osteogénico de las TRCs se comparó con el potencial de otro tipo celular, las MSCs, que se ha

demostrado en la literatura que presentan potencial osteogénico. Las MSCs se cultivan en ausencia de células accesorias y son un tipo celular mucho más purificado. Anteriormente se ha encontrado que las TRCs presentan un potencial osteogénico más alto que las MSCs expresado por cada célula CD90. Se llevaron a cabo experimentos posteriores para verificar que las nuevas TRCs de lavado-recolección mostraban la misma tendencia. En un experimento representativo mostrado en la presente memoria, la frecuencia total de células CD90⁺ era mucho menor en las TRCs (16%) que en las MSCs (99%). Sin embargo, la frecuencia de células doblemente positivas CD15⁺ CD90⁺ (Tabla 9) y el potencial osteogénico (Tabla 9, figura 22) era mucho más alta en las TRCs. Se midió el potencial osteogénico a partir de la deposición del calcio (Ca) (figura 22A) y la actividad de fosfatasa alcalina (AP) (figura 22B) y eran prácticamente 2 veces más altas en las TRCs comparado con las MSCs primarias (P0) expresado por cada célula CD90. El pase adicional de las MSCs condujo a una actividad incluso menor. Estos resultados son consistentes con experimentos realizados anteriormente.

Estos datos demuestran que la composición de las TRCs, específicamente las células CD90⁺, que se producen mediante el procedimiento de lavado-recolección son más potentes que la MSCs en su potencial osteogénico. Las células TRCs CD90⁺ también expresan el marcador CD15 en mayor grado que las células MSCs CD90⁺.

Tabla 14. Comparación entre las TRCs y las MSCs: fenotipo y función

Condición	Potencial osteogénico por cada célula 1E05 CD90 ⁺				
	% de CD90 ⁺	% de CD15 ⁺	% de CD90 ⁺ CD15 ⁺	Deposición de Ca ²⁺ (µg)	Actividad de AP (nmoles de p-nitrofenol)
TRC (lavado Cytomate)	19,92	35,29	14,37	n.d.	n.d.
TRC (lavado-recolección)	16,42	32,17	13,51	9,32	99,739
MSC (P0)	98,56	1,10	1,07	4,83	59,268
MSC (P1)	98,55	0,11	0,10	0,53	23,413
n.d. = no determinado					

Los datos de comparación directa entre las TRCs de lavado-recolección y las TRCs de lavado CYTOMATE[®] han demostrado que los productos TRCs de lavado-recolección presentan un mayor potencial osteogénico. La presencia de CD15 en las células CD90⁺ distingue las TRCs de otros productos celulares purificados (tales como las MSCs) y se correlaciona con un potencial osteogénico incrementado de las CD90s.

Ejemplo 4: Ensayos clínicos: Cicatrización ósea sin inflamación utilizando TRCs aisladas utilizando el lavado CYTOMATE[®]

Fractura de huesos largos - España

Se llevaron a cabo dos estudios de fracturas de huesos largos en centros en España, bajo autorización de comités éticos. Un ensayo clínico de fase I en el Hospital General de l'Hospitalet, Centro Medico Teknon y Hospital de Barcelona-SCIAS incluyó cinco pacientes que fueron tratados para sus fracturas no unidas de huesos largos. Un revisor independiente de tercera parte informó utilizando imágenes radiográficas (figura 3) o la observación clínica de que la totalidad de los cinco pacientes, con un total de seis fracturas tratadas, se había curado.

La figura 35 muestra el resultado clínico para un paciente que había caído de un andamio y se había roto ambas tibias. No se produjo la cicatrización en ninguno de los hueso tras la primera cirugía. Se llevó a cabo una segunda cirugía utilizando TRCs y un portador de matriz cerámica. Tras 6 meses, tanto las líneas de fractura como algo de matriz resultan visibles bajo rayos X. A los 12 meses la línea de fractura había desaparecido y el paciente se había curado, aunque todavía podía observarse cierta cantidad de material residual de matriz. A los 18 meses (no mostrado), la matriz se había reabsorbido totalmente y el paciente había vuelto al duro trabajo de una cantera.

No se observaron sucesos adversos relacionados con las TRCs. Se utilizó el producto TRCs en dicho estudio temprano. Los pacientes recibieron implantes de material de matriz de CALCIBON[®] (gránulos de fosfato cálcico) mezclado con células TRC y ligado con plasma autólogo para potenciar las propiedades de manipulabilidad. Éste fue el primer estudio en el que se utilizó plasma para ligar las partículas de matriz para mejorar la manipulabilidad.

Tras el ensayo de fase I, se presentó un dossier de producto medicinal en investigación (IMPD), la presentación requerida en la Unión Europea (UE) para un ensayo clínico, y se obtuvo la autorización de la Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) para iniciar un ensayo de fase II de no uniones de fractura en España. Este estudio ha completado el tratamiento de TRCs de la totalidad de los 10 pacientes.

Se utilizaron las TRCs de la presente invención en dicho estudio. Los pacientes recibieron implantes de partículas de

matriz VITOSS® (β -TCP) mezcladas con TRCs y ligadas con plasma para facilitar la manipulación.

Globalmente, 34 pacientes completaron el seguimiento posterior al tratamiento a los seis meses y 33 completaron el seguimiento a los 12 meses. Los 33 pacientes seguidos durante 12 meses mostraron una tasa de curación global del 91%, determinada por la formación de puentes óseos observados en imágenes radiográficas o tomografía computerizada. Los resultados finales mostraron éxito de cicatrización en el 91% (21 de 23) de las fracturas de tibia, en el 100% (3 de 3) de las fracturas de húmero y en el 86% (6 de 7) de las fracturas de fémur. Además de la tasa de cicatrización del 91% observada tras 12 meses, los resultados a los seis meses mostraron que la formación de puentes óseos se había producido con éxito en el 85% (29 de 34) de los pacientes y que se encontraban presentes indicios de cicatrización temprana (formación de callo) en el 97% (33 de 34) de los pacientes. Tres pacientes no completaron las visitas de seguimiento requeridas. Aunque no pudieron recogerse los datos finales de dichos tres pacientes, dos mostraron cicatrización a los 18 meses. No se informó de sucesos adversos relacionados con las células. Los resultados sugieren que las TRCs resultan eficaces para el tratamiento de no uniones de fracturas recalcitrantes de huesos largos y presentan el potencial de convertirse en una potente nueva herramienta para la regeneración ósea y para la mejora del control de las fracturas severas.

Reconstrucción maxilofacial:

Se completó un ensayo de control de la viabilidad clínica de la regeneración del hueso de mandíbula (maxila) en Barcelona, España, para pacientes edéntulos con pérdida ósea severa que requerían un procedimiento de elevación del seno de manera que pudiesen colocarse implantes dentales. Este ensayo de viabilidad alistó los 5 pacientes diana para la evaluación de la regeneración ósea, resultando de TRCs en comparación con un procedimiento estándar de injertación ósea. Los pacientes recibieron partículas de matriz BIOOSS® (hueso bovino) mezcladas con TRCs y ligadas con plasma autólogo. Cuatro meses después de la terapia celular, los tratamientos que incluían TRCs habían reducido la inflamación y un incremento de altura significativo del hueso en el área injertada según se determinó en imágenes radiográficas. Las observaciones histológicas realizadas en secciones de tejido contiguas al área injertada mostraron cambios consistentes con la estimulación de la renovación ósea y con la inducción de nuevo tejido conectivo.

Inflamación reducida en pacientes tratados con TRCs

Los ensayos clínicos de fase I/II iniciales para evaluar las TRCs para la cicatrización de no uniones de fracturas de huesos largos y la reconstrucción de huesos mandibulares han demostrado una reparación ósea significativa con reducción de la hinchazón, el dolor, el enrojecimiento y la inflamación postoperatorias dentro de las 24 horas posteriores a la operación. Ésta era una observación inesperada fuera del alcance de los ensayos y fue advertida en Barcelona y en múltiples sitios de U.S. en pacientes que habían recibido terapia de TRCs.

Esta observación ha conducido a estudios preclínicos adicionales centrados en la caracterización de la función inmunomoduladora o antiinflamatoria de la mezcla de TRCs. Los resultados de estos estudios demuestran que las TRCs expresan un perfil inmunomodulador para la regeneración y reparación óptimas del tejido con un nivel mínimo de inflamación. Más específicamente, las TRCs contienen una mezcla de tipos celulares que expresan actividades regenerativas de tejido e inmunomoduladoras, incluyendo macrófagos activados alternativamente ($CD45^+CD14^+IL-10^+$), células madre mesenquimales ($CD45^+CD90^+CD105^+$), células T reguladoras ($CD45^+CD4^+CD25^+$) y otros linfocitos. En particular, los linfocitos $CD3^+$ producen niveles elevados de IL-10, una citoquina inmunomoduladora, tras la inducción a través del complejo receptor de células T-CD3 (figura 23-C). Las TRCs también expresan varias citoquinas inmunorreguladoras potentes, incluyendo HGF, antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-6, IL-10, TGF- β y MCP-1 a nivel tanto génico como proteico. Las TRCs no expresan, o expresan a niveles muy bajos, mediadores proinflamatorios cruciales, incluyendo IL-1, IFN γ , TNF α y más notablemente IL-12 a nivel tanto génico como proteico. Las TRCs pueden inducirse para la expresión de un enzima regulador inmunológico clave denominado indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO ha sido implicada mecanísticamente en la regulación negativa de respuestas inflamatorias tanto nacientes como continuas. Además, las TRCs demuestran una actividad estimuladora 10 a 50 veces menor en la reacción alo-mixta de linfocitos (MLR) en comparación con células presentadoras de antígenos profesionales, demostrando un potencial para la activación de las respuestas inflamatorias adaptativas o mediadas por células T.

Colectivamente, estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que las TRCs polarizan o apartan fuertemente la respuesta del huésped de la inflamación destructora de tejido y hacia la reparación de heridas, con una cicatrización más rápida de los tejidos dañados.

Evidencia de inducción ósea temprana y vascularización incrementada durante la cicatrización ósea

Un paciente con una no unión de fractura en el ensayo US era incumplidor con las citas, fumador y soportó peso en la pierna en cicatrización prematuramente, resultando en una ruptura de la fijación interna y un callo nuevo a los 3 meses. Tras sustituir la placa, se extrajeron biopsias de la parte media del callo, se fijaron y se procesaron para inclusión en metacrilato de metilo y secciones teñidas calcificadas. La histología cuantitativa muestra hueso tejido en

el exterior del callo. En el interior, se encontró hueso lamelar sobre la superficie de partículas de matriz del aloinjerto o del aloinjerto de sustitución (figura 32). La médula era fibrosa y se encontraba muy bien vascularizada por vasos arteriales maduros y venulares de tipo sinusoidal. Aparentemente algunos vasos pequeños atravesaban las partículas de aloinjerto. Se observaron muy ocasionalmente osteoclastos, indicativos de remodelado óseo, sobre las superficies óseas en dichas regiones. La mayoría de las superficies se encontraban revestidas de láminas de osteoblastos y osteoide. La microscopía óptica polarizada mostraba núcleos de aloinjerto retenido, aunque una cantidad inesperada de injerto había sido sustituida por hueso lamelar. Estos resultados proporcionan evidencia de osteoinducción, osteoconducción e integración ósea; sin embargo, el hueso nuevo en el callo todavía no era maduro ni se encontraba totalmente mineralizado. Este caso mostraba inducción y cicatrización óseas muy tempranas, pero el callo todavía requería tiempo para mineralizarse para ganar resistencia biomecánica.

La figura 32 muestra la histología del callo reparador. La figura 32A muestra osteoblastos y hueso nuevo al cubrir el osteoide la mayor parte de las superficies de hueso y aloinjerto. Observar los vasos sanguíneos y la médula fibrosa. Fotomicrografías de campo brillante (figura 32B) y polarizadas (figura 32C) de la misma sección muestran vasos sanguíneos penetrantes en las DBM del aloinjerto (lamelas paralelas) y hueso tejido nuevo en sustitución del aloinjerto sobre la superficie y en el interior. Observar el estroma fibroso bien vascularizado y la abundancia de osteoblastos.

Regeneración vascular clínica

Basándose en las observaciones de Aastrom de que las TRCs presentan la capacidad de formar vasos sanguíneos pequeños, y ensayos de terceros que han utilizado células de médula ósea para la enfermedad vascular periférica, se inició un ensayo para evaluar la seguridad y la eficacia de las TRCs en el tratamiento de diabéticos con heridas abiertas e isquemia crítica de las extremidades. Aastrom firmó un acuerdo de ensayo clínico con la Heart & Diabetes Center, situada en Bad Oeynhausen, Alemania, con el fin de realizar un ensayo piloto para evaluar la seguridad y potencial eficacia de las TRCs en la mejora de la circulación periférica en pacientes diabéticos con heridas abiertas e isquemia crítica de las extremidades. Para incluir un paciente en el estudio debía presentar una herida abierta que no había cicatrizado y que no hubiese mostrado ninguna tendencia a cicatrizar durante por lo menos las 6 semanas previas a la inclusión. El estudio continúa con hasta 30 pacientes. Los investigadores informaron de que los pacientes tratados con TRCs cicatrizaron sus heridas abiertas no cicatrizantes en 48 y 44 semanas, respectivamente (figura 32) y mostraron una mejora en la formación de vasos colaterales (figura 33). El estándar actual de atención de este ensayo mostró que no habían cicatrizado las heridas abiertas.

Doce meses después del tratamiento todos los pacientes en el análisis preliminar que habían sido tratados con TRCs informaron de que no se habían realizado amputaciones mayores, no se habían observado sucesos adversos relacionados con las células, y que habían cicatrizado todas las heridas abiertas. Para los dos pacientes bajo el estándar de atención, que sólo habían recibido cuidados de las heridas (no habían recibido células), un paciente fue sometido a una amputación mayor y un paciente no experimentó mejora en la cicatrización de heridas tras 12 meses.

Reparación del hueso

Se inició un ensayo para evaluar la seguridad y la eficacia de las TRCs en el tratamiento de la osteonecrosis. Aastrom firmó un acuerdo de ensayo clínico con el Orthopedic Institute, Konig-Ludwig-Haus en la universidad de Wurzburg, Alemania, situado en Bad Oeynhausen, Alemania, con el fin de llevar a cabo un ensayo piloto para evaluar la seguridad y potencial eficacia de las TRCs en la reparación ósea en pacientes que presentaban osteonecrosis de la cabeza femoral. La osteonecrosis de la cabeza femoral implica la muerte de células en el hueso y la médula dentro de la cabeza del fémur y en muchos casos conduce a la sustitución total de cadera. Se trataron cuatro pacientes con TRCs en el estudio inicial. Todos los pacientes toleraron bien el procedimiento; informaron de una reducción del dolor de cadera, sin indicios de avance de la enfermedad según la MRI y los rayos X, y volvieron al trabajo dentro de los 6 meses posteriores al tratamiento. Además, no se observaron sucesos adversos relacionados con las células y ninguno de estos pacientes han requerido cirugía de prótesis de cadera.

Mezcla TRCs y desmineralización de la matriz del hueso (DBM) en el Clínico

El cirujano recibe una bolsa de suspensión de células TRC y añade la solución a una cantidad previamente medida de DBM en una placa suministrada para la mezcla. A continuación, se ligó la mezcla de TRC/DBM con el plasma del paciente para crear un implante sólido (figura 33A) con propiedades de manipulación mejoradas. Aastrom ha realizado un amplio desarrollo de la formulación y método con el fin de evaluar este procedimiento, y considera firmemente que las células siguen siendo viables y funcionales durante este procedimiento de mezcla (figuras 33B y 34B, posteriormente).

La figura 33A muestra una mezcla de TRC/DBM implantable que ha sido ligada con plasma autólogo. Las TRCs siguen siendo viables en la mezcla, tal como puede observarse en la fotomicrografía 4X con tinción live/dead de 24 horas (figura 33B).

La figura 34A y B muestra que las TRCs en la mezcla de aloinjerto/plasma son viables tras la mezcla y que son capaces de una proliferación considerable, tal como puede observarse a partir del incremento del metabolismo durante 2 semanas. Observar el gran incremento de la densidad celular en las fotomicrografías entre los días 1 (figura 29B, anteriormente) y 14 (figura 34B) (ambas a 4X).

La figura 35 muestra que las TRCs siguen siendo funcionales en los constructos de DBM/plasma, manteniendo una secreción de citoquinas importante durante un periodo de cultivo de 2 semanas.

Conjuntamente, este conjunto de datos clínicos con TRCs sometidas a lavado Cytomate® demuestra los aspectos osteogénicos, vasculo/angiogénicos y antiinflamatorios/inmunomoduladores del producto celular mixto de TRCs. La nueva composición de materia que proporciona células de viabilidad y número estadísticamente superiores, especialmente en los linajes de células madre/progenitoras/endoteliales conduce a un producto clínico más funcional. Las TRCs del nuevo procedimiento de lavado-recolección han sido optimizadas para su fabricabilidad y función, y presentan propiedades de reparación de tejidos superiores a las de los productos celulares clínicos utilizados anteriormente.

Ejemplo 5: Las TRCs aisladas utilizando el método de lavado-recolección incluyen células T reguladoras que secretan la citoquina antiinflamatoria IL-10

Las células de reparación de tejidos producidas utilizando el procedimiento de lavado-recolección se evaluaron mediante citometría de flujo. Las células recolectadas se tiñeron para el análisis de dos colores utilizando mAbs de control irrelevantes de isotipo correspondiente (IgG1, IgG2a) (figura 23A) o mAbs anti-CD25 más anti-CD4 específicas conjugadas con fluorocromo (figura 23B). Tal como se demuestra en la figura 23B (cuadrante B2), una población diferenciada de linfocitos (2%) coexpresa los marcadores CD4⁺ y CD25⁺, un fenotipo de superficie asociado a las células T reguladoras.

En la figura 23C se muestran experimentos similares para evaluar la producción de citoquinas por parte de las células T en la mezcla de TRCs. Se incubaron las TRCs solas o en presencia de mAb anti-CD3 inmovilizadas en plástico (100 ng/ml) a modo de estímulo policlonal para la activación de las células T. Se determinaron las concentraciones de citoquina en líquidos sobrenadantes de 48 horas mediante análisis multiplex Luminex. Resulta interesante que estos resultados demuestran que IL-10 es la citoquina predominante (>14,669 pg/ml) producida por las células T en la mezcla de TRCs tras la activación con anticuerpo monoclonal anti-CD3. IL-10 es una citoquina inmunomoduladora producida característicamente por las células T reguladoras y los macrófagos inmunomoduladores.

Ejemplo 6: Las TRCs liberan HGF, una citoquina inmunomoduladora y angiogénica

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una citoquina inmunomoduladora y angiogénica crucial derivada de células mesenquimales que media en la formación vascular, en la endotelialización y en la maduración vascular, incluyendo la migración y el reclutamiento de las células perivasculares, tales como las células de músculo liso y los pericitos. El HGF suprime la fibrosis tras la lesión de los tejidos. Esta citoquina controla la diferenciación de los monocitos hacia la función celular inmunorreguladora y accesoria tolerogénica. Resulta interesante que el HGF también se ha demostrado que reduce el rechazo agudo y crónico del aloinjerto, sugiriendo la existencia de un potente mecanismo antiinflamatorio.

Se evaluó la producción de HGF por parte de las TRCs mediante la obtención del líquido sobrenadante de cultivo desde la vía de residuos del sistema de producción celular (ver las figuras 1 a 10) el día 12 de cultivo. Estos cultivos se mantuvieron bajo condiciones de perfusión del medio o sin intercambio del medio en forma de cultivo estático a escala clínica. Se derivaron células madre mesenquimales (MSCs) de los mismos donantes de médula ósea, en paralelo mediante pase repetido en matraces de cultivo de tejidos (matraces T) para la comparación a modo de control positivo de la secreción de HGF. Se evaluaron líquidos sobrenadantes de cultivo de estos cultivos de TRCs y MSCs para HGF mediante ELISA. Los valores medios (pg/ml) para n=6 experimentos se muestran en la figura 26. Estos datos demuestran que las TRCs secretan consistentemente niveles elevados de HGF, un potente mediador angiogénico e inmunomodulador, con independencia de la tasa de perfusión de medio en comparación con las MSCs derivadas convencionalmente.

Las TRCs se evaluaron en una respuesta alogénica mixta de leucocitos (aloMLR) como medio para determinar el potencial de activación de respuestas inflamatorias adaptativas o mediadas por células T (figura 30). Algunos mediadores inflamatorios tales como el interferón γ (IFN- γ) inducen una expresión elevada por parte de las TRCs de enzimas inmunomoduladoras, incluyendo laIDO (figuras 24, 25 y 27) y otros ligandos inmunoinhibidores tales como PD-L1 (figura 28). Por lo tanto, las TRCs se incubaron con (inducidas) o sin (no inducidas) 1.000 unidades/ml de interferón humano recombinante durante 24 horas antes de la adición a la MLR. Tras la exposición a IFN- γ , se irradiaron las TRCs (2.000 Rads) y se incubaron en la MLR en un abanico de dosis celulares consistente de 2.000, 10.000 ó 50.000 TRCs conjuntamente con una dosis fija de 10⁵ células T alogénicas sensibles por micropocillo en

5 cultivos por triplicado. Se evaluó la proliferación de las células T a partir de la incorporación de ³H-timidina medida a partir de los pulsos por minuto (cpm) el día 6 de cultivo. Tal como se muestra en la figura 30, las TRCs demostraron una inesperada reducción hasta niveles de fondo de la actividad estimuladora de las células T tras la exposición breve a mediadores inflamatorios tales como IFN- γ . Estos datos indican que existe una actividad reductora o potencialmente inhibidora de las TRCs contra las respuestas inflamatorias mediadas por las células T.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Composición de células aisladas para la reparación de tejidos, que comprende una población mixta de células de linaje hematopoyético, mesenquimal y endotelial, en la que la viabilidad de dichas células es por lo menos del 80% y la composición contiene:
- a) aproximadamente 5% a 75% de células CD90⁺ viables, siendo las células restantes en dicha composición, CD45⁺,
- 10 b) menos de 2 mg/ml de albúmina de suero bovino, c) menos de 1 mg/ml de un reactivo de recolección enzimáticamente activo seleccionado de entre el grupo que consiste de tripsinas, colagenasas, enzimas de origen microbiano, agentes de disociación, proteasas o mezclas de los mismos, y d) sustancialmente libre de micoplasmas, endotoxinas y contaminación microbiana.
- 15 **2.** Composición según la reivindicación 1, en la que las células se derivan de células mononucleares, que se derivan de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o hígado fetal.
- 3.** Composición según la reivindicación 1, en la que dichas células se encuentran en una solución de electrolitos de grado farmacéutico que resulta adecuada para la administración humana.
- 20 **4.** Composición celular según la reivindicación 1, en la que las células producen por lo menos una citoquina antiinflamatoria o factor angiogénico.
- 5.** Composición celular según la reivindicación 1, en la que dichas células producen menos de 10 pg/ml por periodo de 24 horas por 10⁵ células de una o más citoquinas proinflamatorias.
- 25 **6.** Composición celular según la reivindicación 1, en la que las células expresan 2,3-dioxigenasa o PD-L1.
- 7.** Composición según la reivindicación 1, en la que por lo menos 10% de dichas células CD90⁺ coexpresan CD15.
- 30 **8.** Composición según la reivindicación 1, en la que dichas células CD45⁺ son CD14⁺, CD34⁺ o VEGFR1⁺.
- 9.** Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición se encuentra sustancialmente libre de suero de caballo y/o de suero fetal bovino.
- 35 **10.** Composición según la reivindicación 1, en la que el número total de células viables es de entre 35 millones y 300 millones.
- 11.** Composición según la reivindicación 10, en la que dichas células se encuentran en un volumen inferior a 15 mililitros, inferior a 10 mililitros o inferior a 7,5 mililitros.
- 40 **12.** Composición según la reivindicación 1, en la que la composición celular resulta útil en el tratamiento de patologías seleccionadas de entre el grupo que consiste de condiciones isquémicas, condiciones que requieren la regeneración de órganos o tejidos, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.
- 45 **13.** Composición según la reivindicación 1, en la que la tripsina es de origen animal, microbiano o recombinante.
- 14.** Composición según la reivindicación 5, que comprende además una matriz biocompatible.
- 50 **15.** Reactivo de reparación de tejidos que comprende la composición según la reivindicación 1.

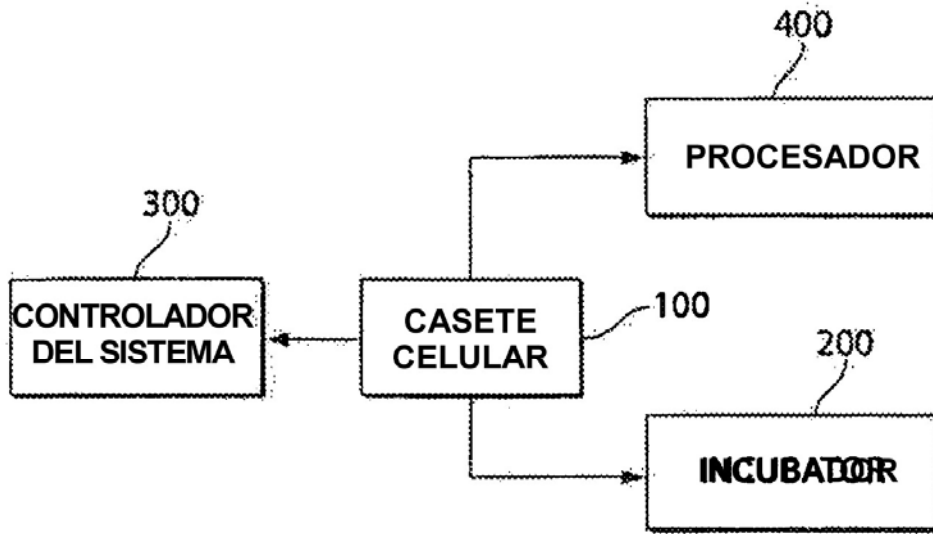


Fig. 1

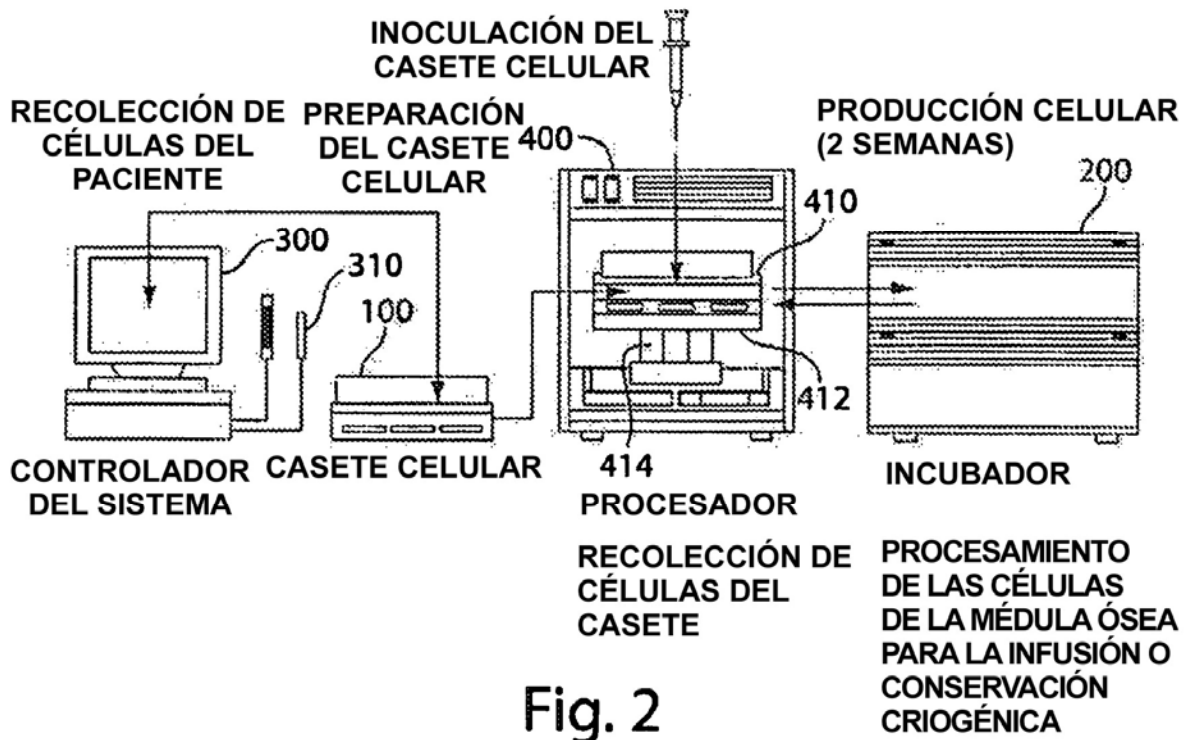


Fig. 2

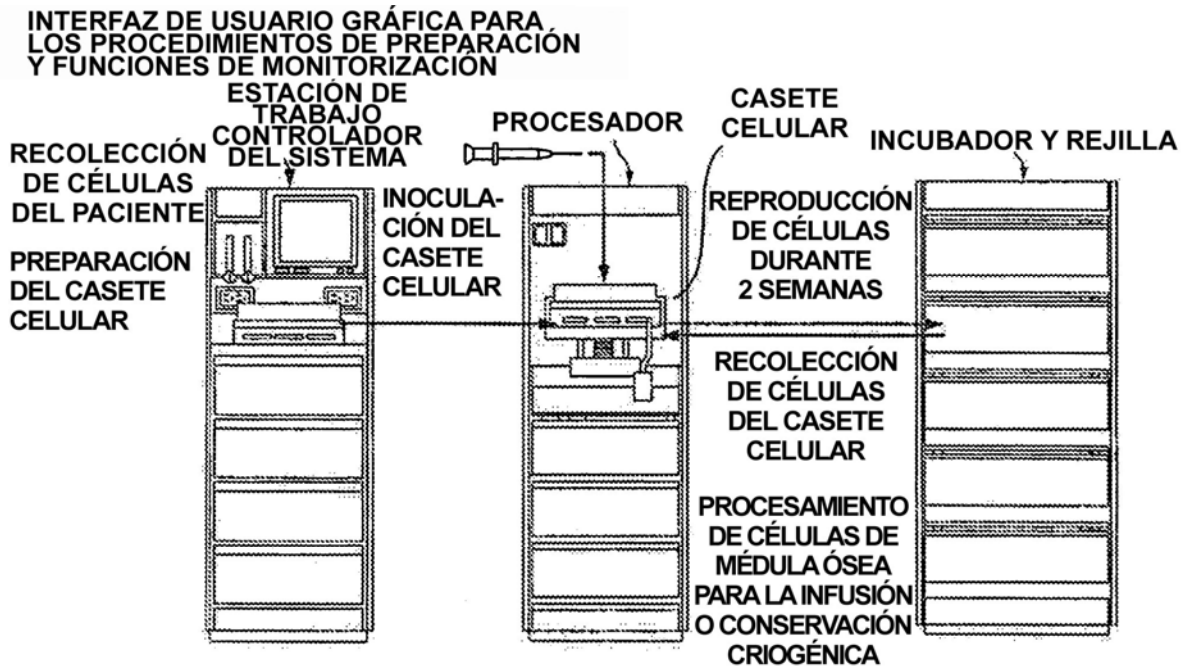


Fig. 3

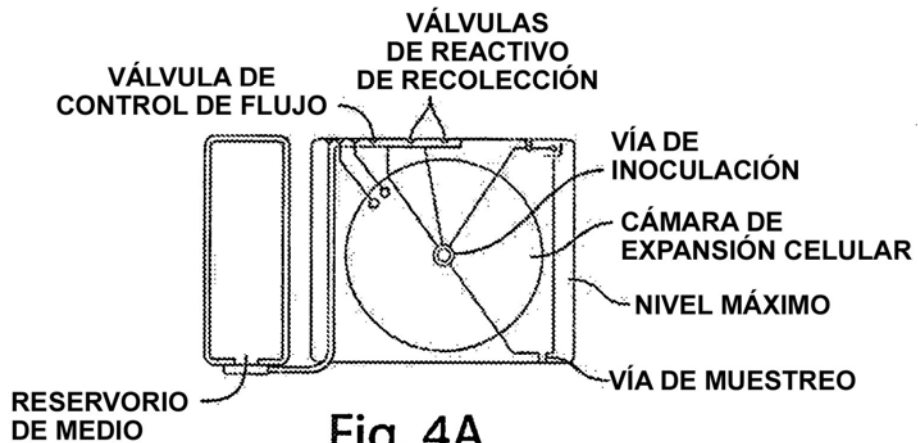


Fig. 4A

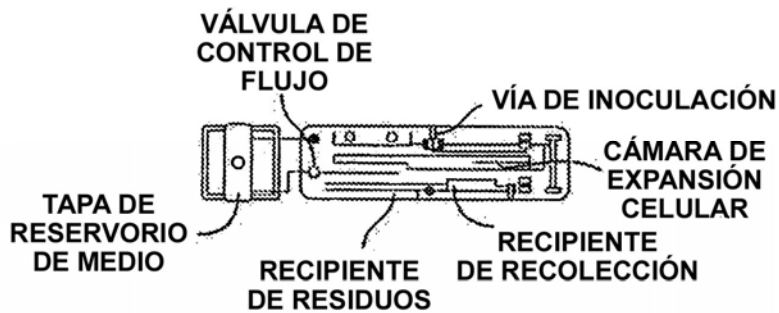


Fig. 4B

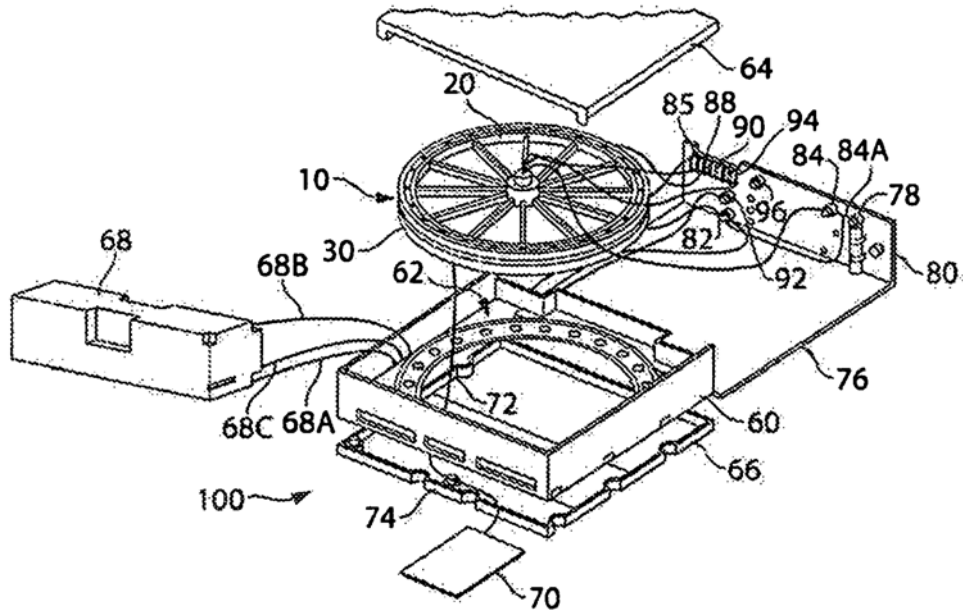


Fig. 5

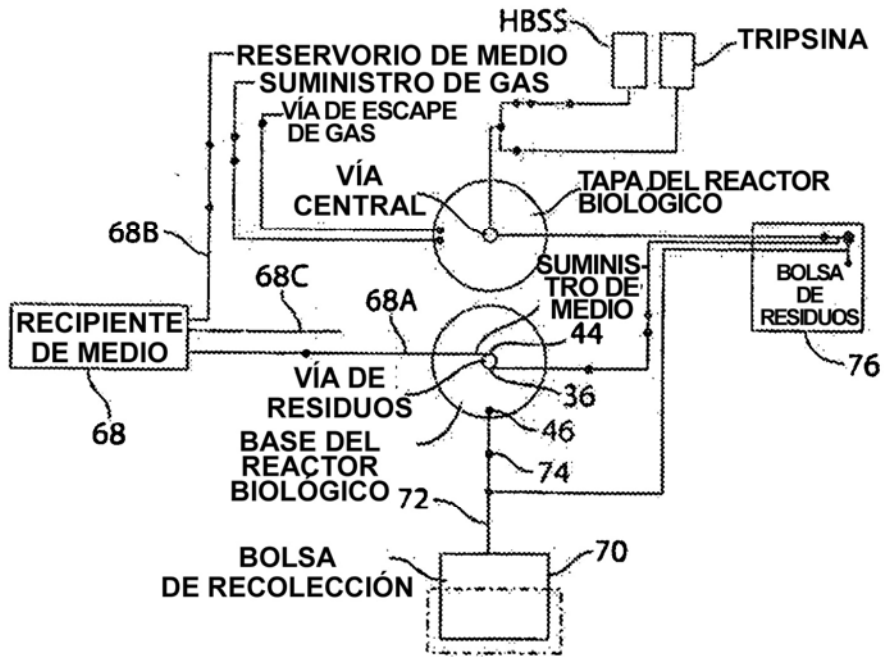


Fig. 6

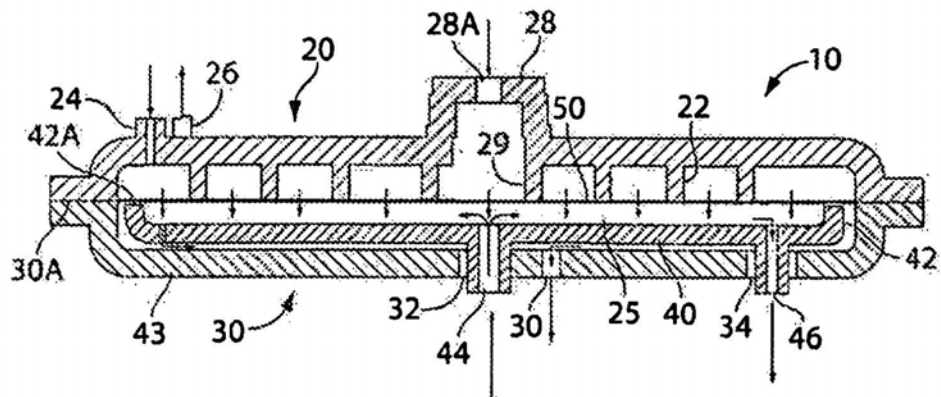


Fig. 7

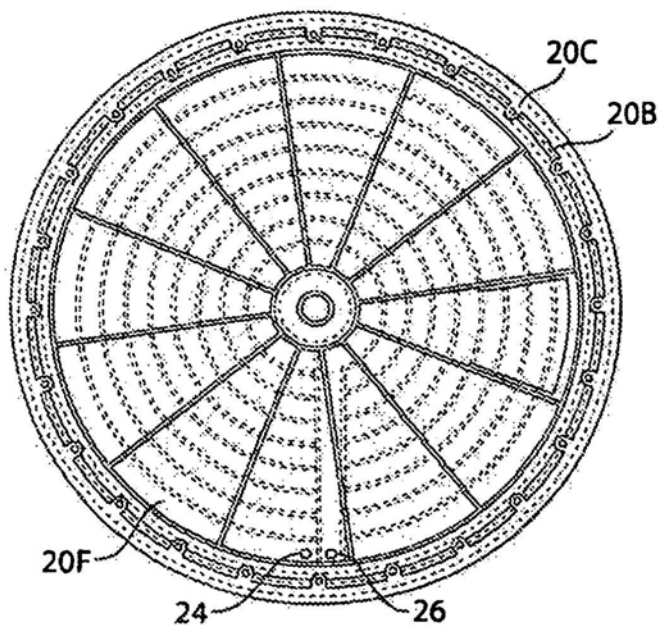


Fig. 8A

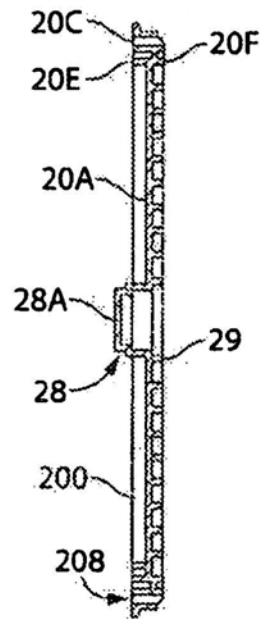


Fig. 8B

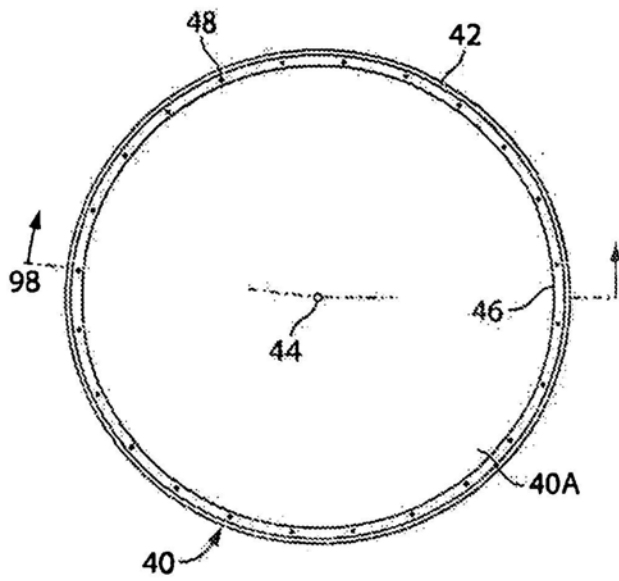


Fig. 9A

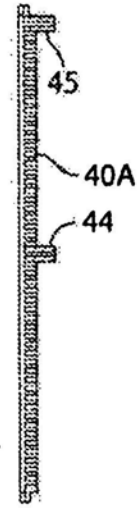


Fig. 9B

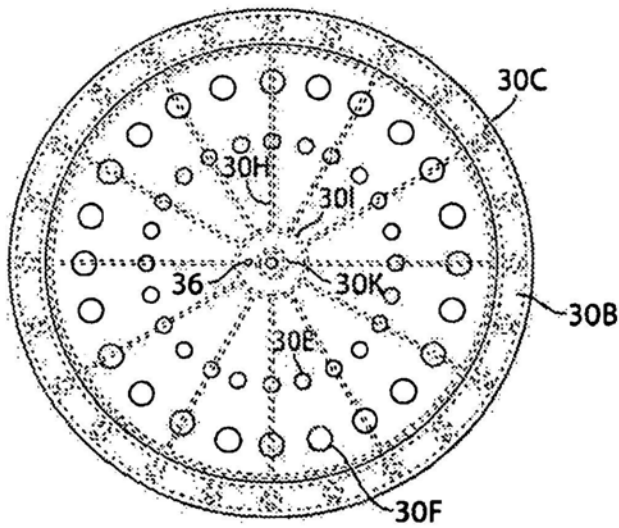


Fig. 10A

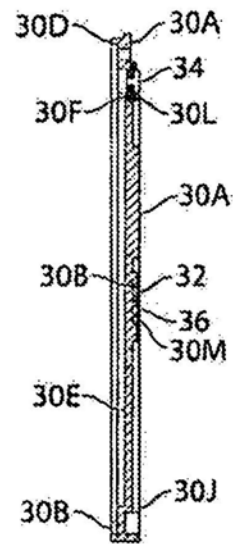


Fig. 10B

PROPORCIÓN NUEVO/CYTOMATE - LOS VALORES DE p EN NEGRITA DEMUESTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE EL NUEVO PROCEDIMIENTO Y EL UTILIZADO ACTUALMENTE

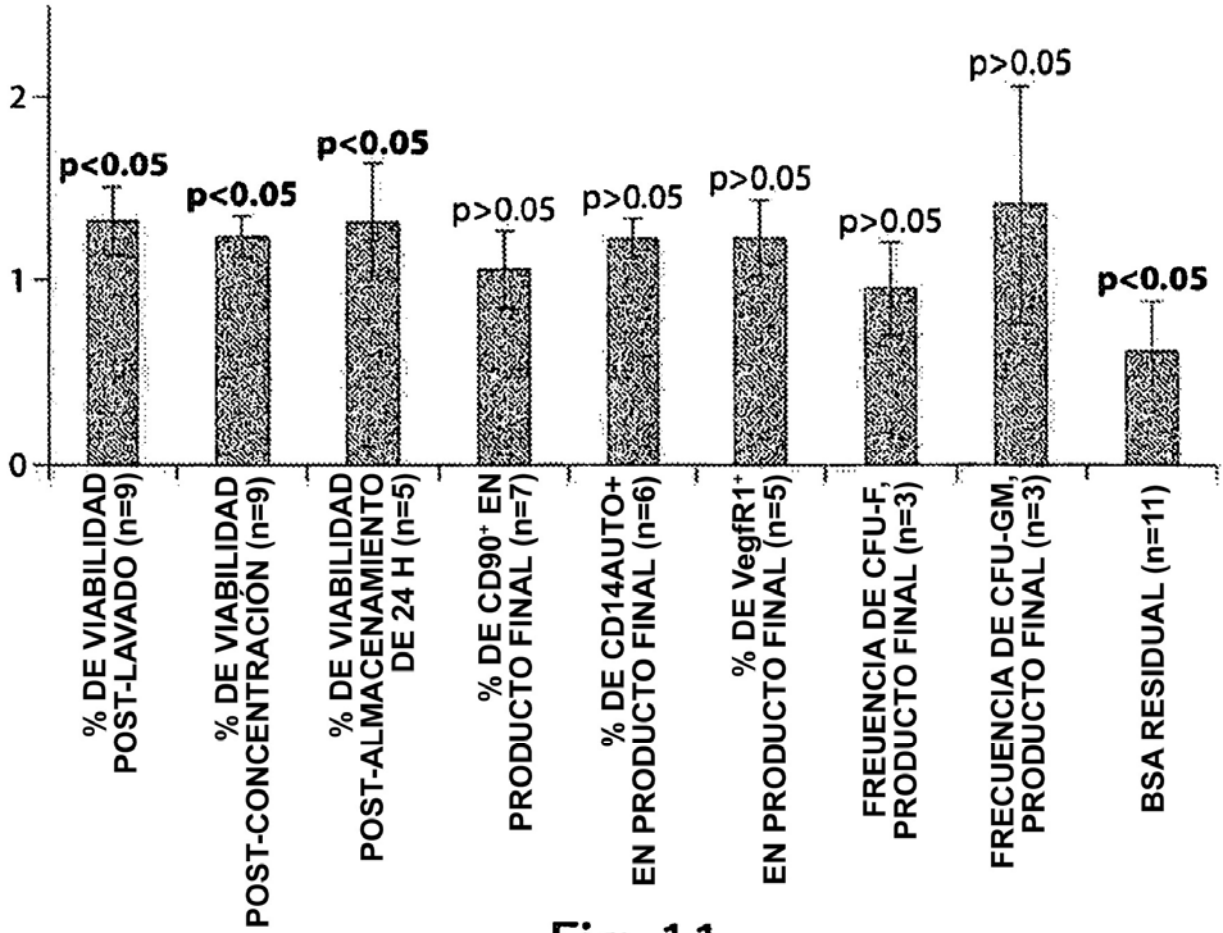


Fig. 11

PROPORCIÓN NUEVO/CYTOMATE - LOS VALORES DE p EN NEGRITA DEMUESTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE EL NUEVO PROCEDIMIENTO Y EL UTILIZADO ACTUALMENTE

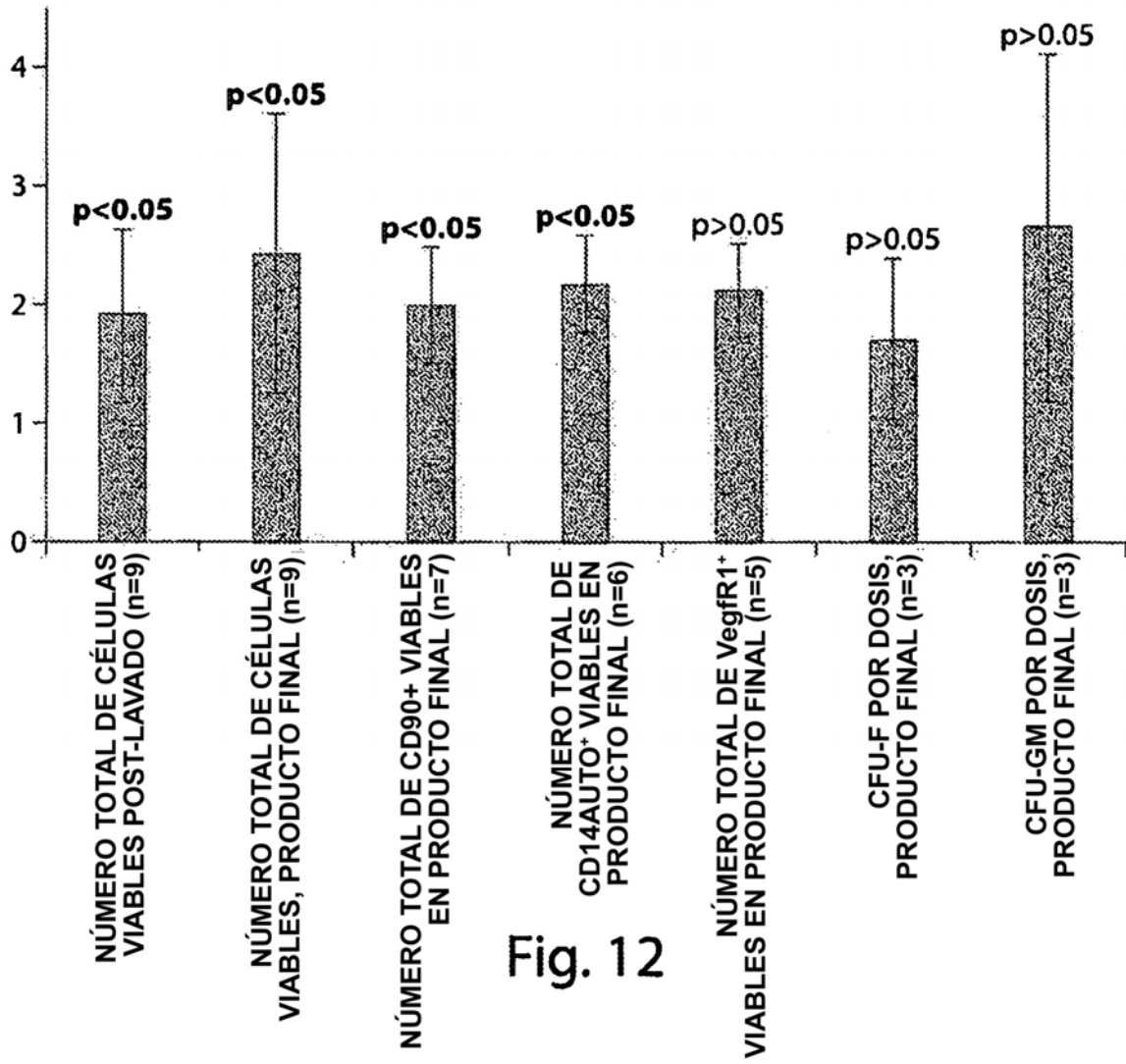


Fig. 12

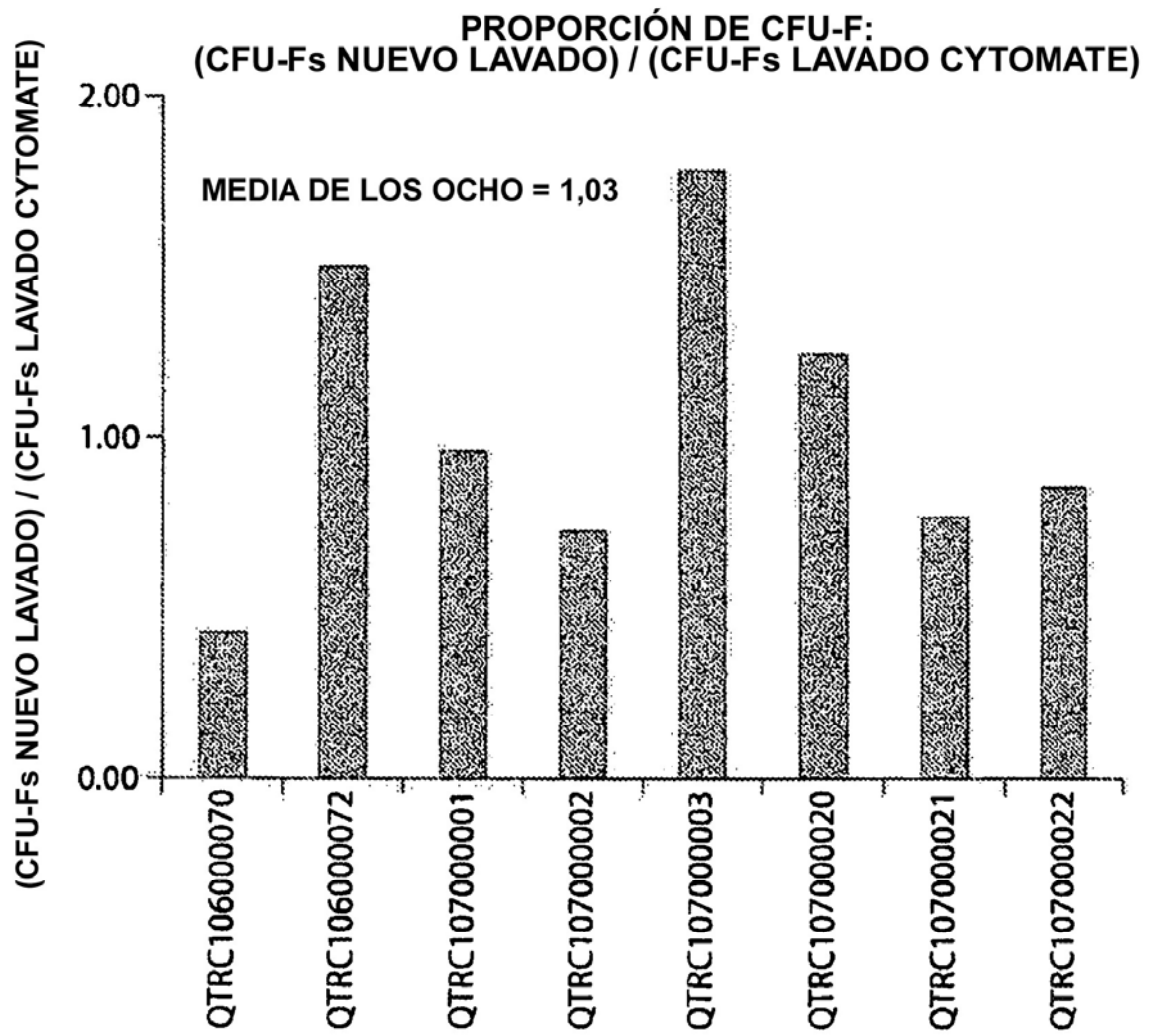


Fig. 13

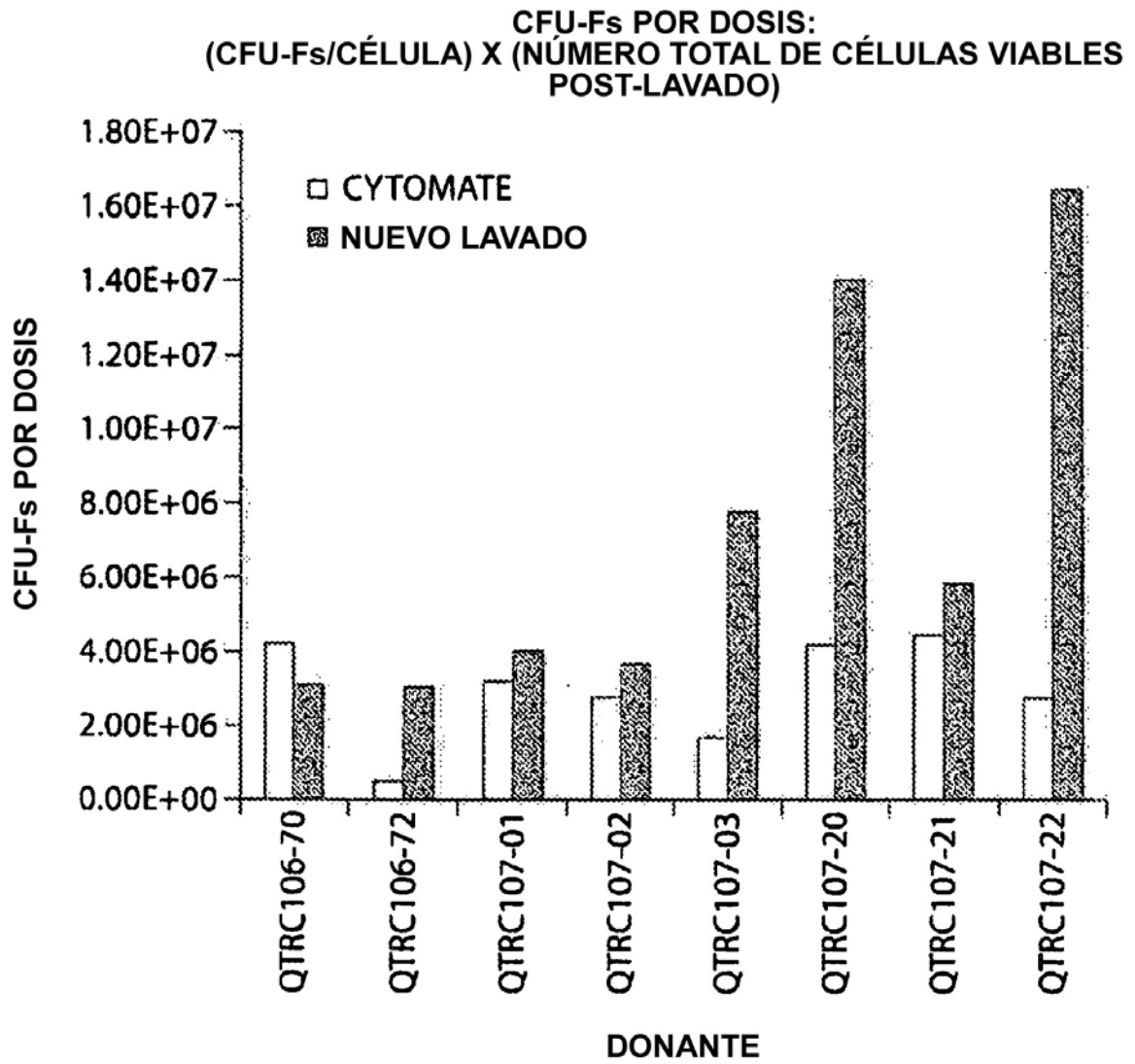


Fig. 14

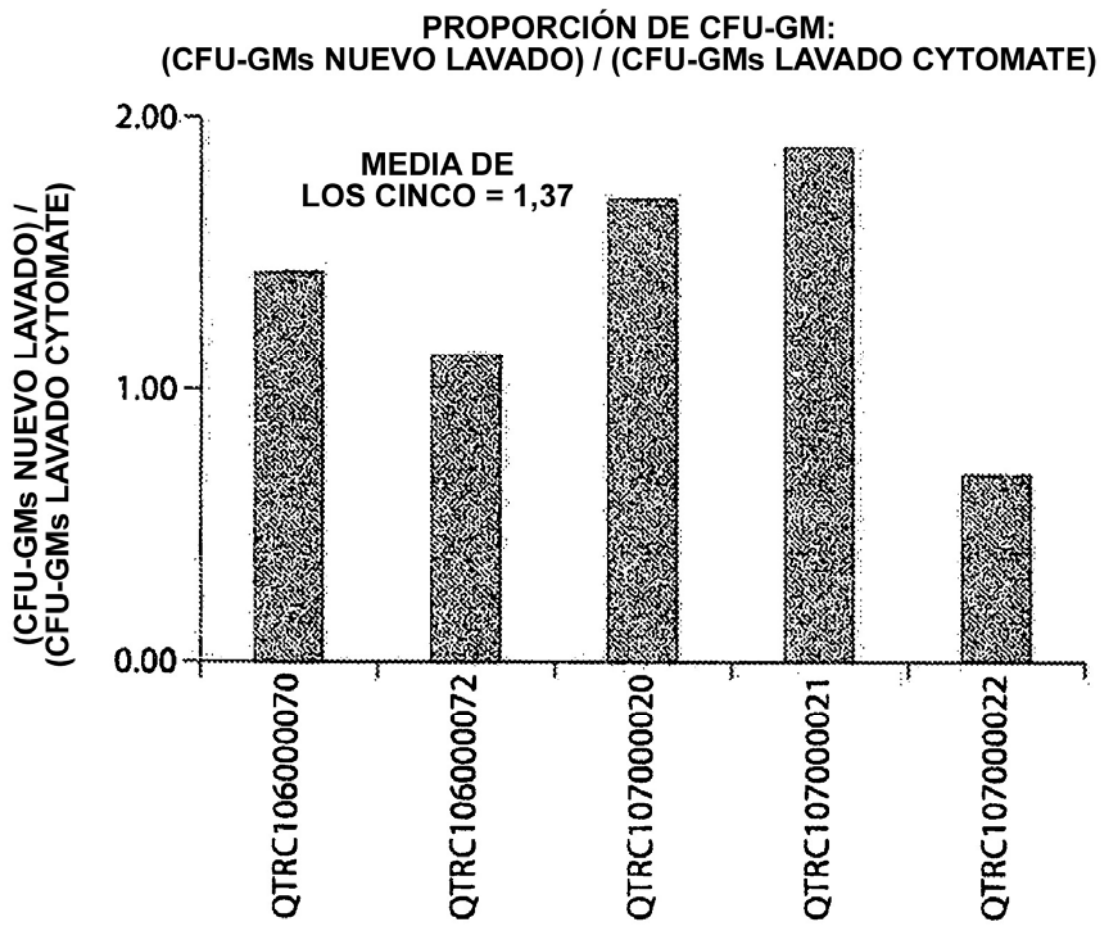


Fig. 15

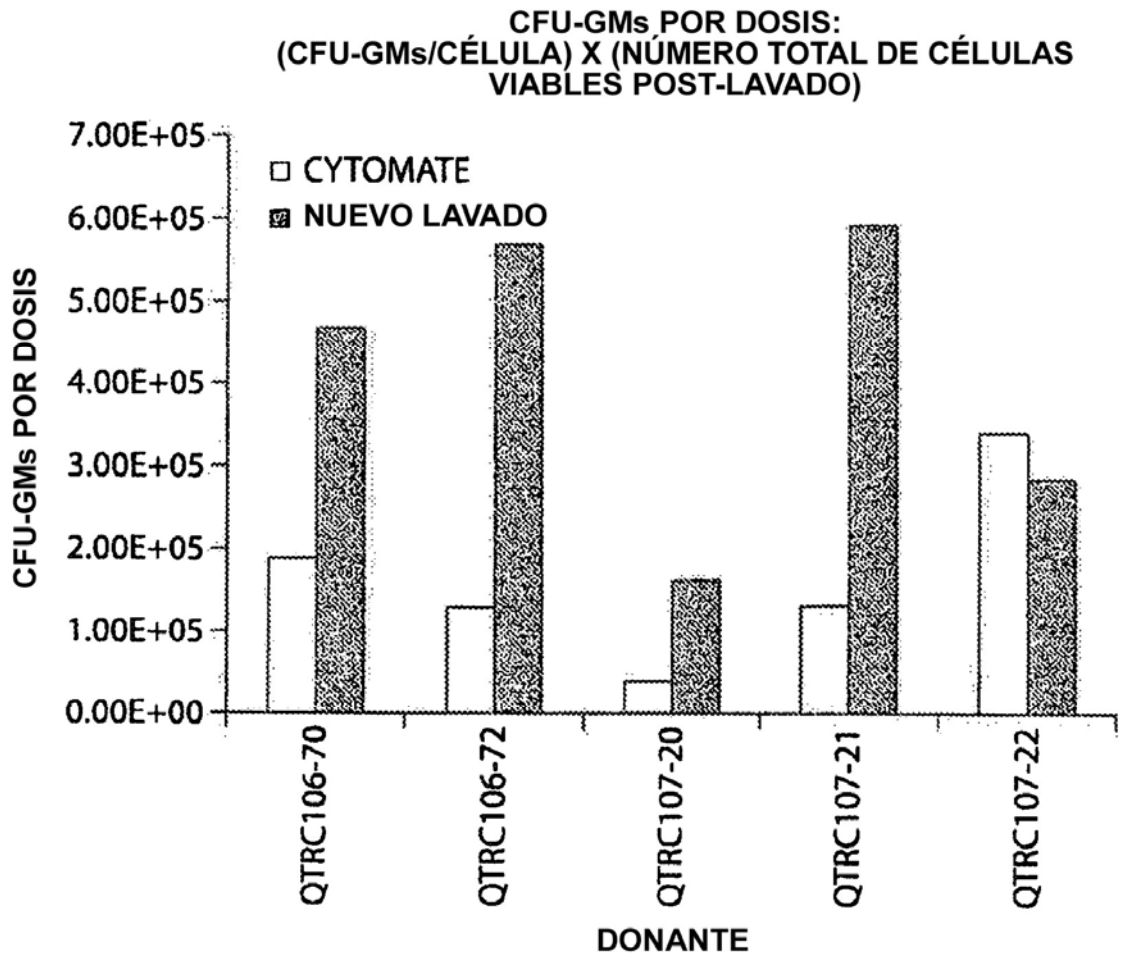


Fig. 16

**PRODUCTO DEL NUEVO LAVADO
ADMINISTRACIÓN DE TRCs POR UNA AGUJA TRAS 24 HORAS
DE ALMACENAMIENTO A 4°C
VIABILIDAD SEGÚN NUCLEOCOUNTER**

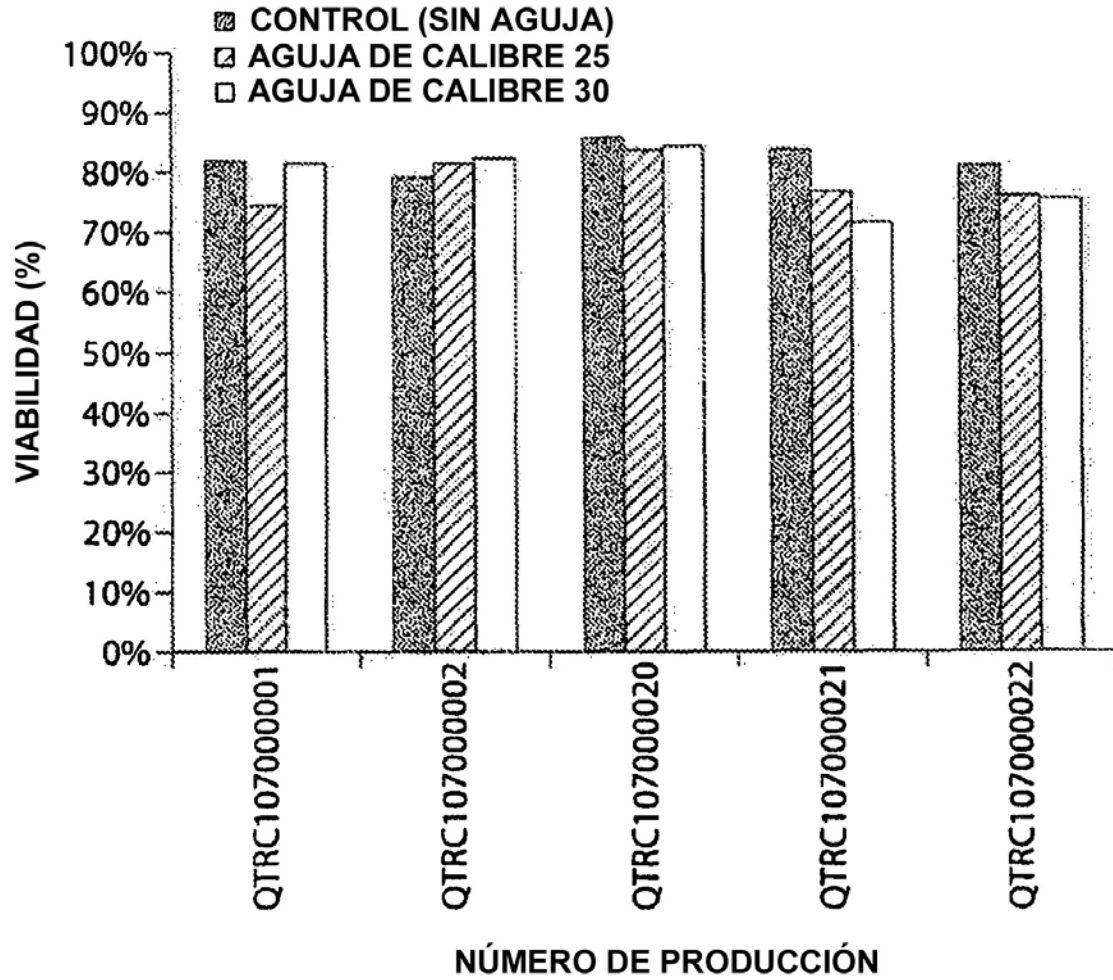


Fig. 17

**PRODUCTO DE LAVADO CYTOMATE
ADMINISTRACIÓN DE TRCs POR UNA AGUJA TRAS 24 HORAS
DE ALMACENAMIENTO A 4°C
VIABILIDAD SEGÚN NUCLEOCOUNTER**

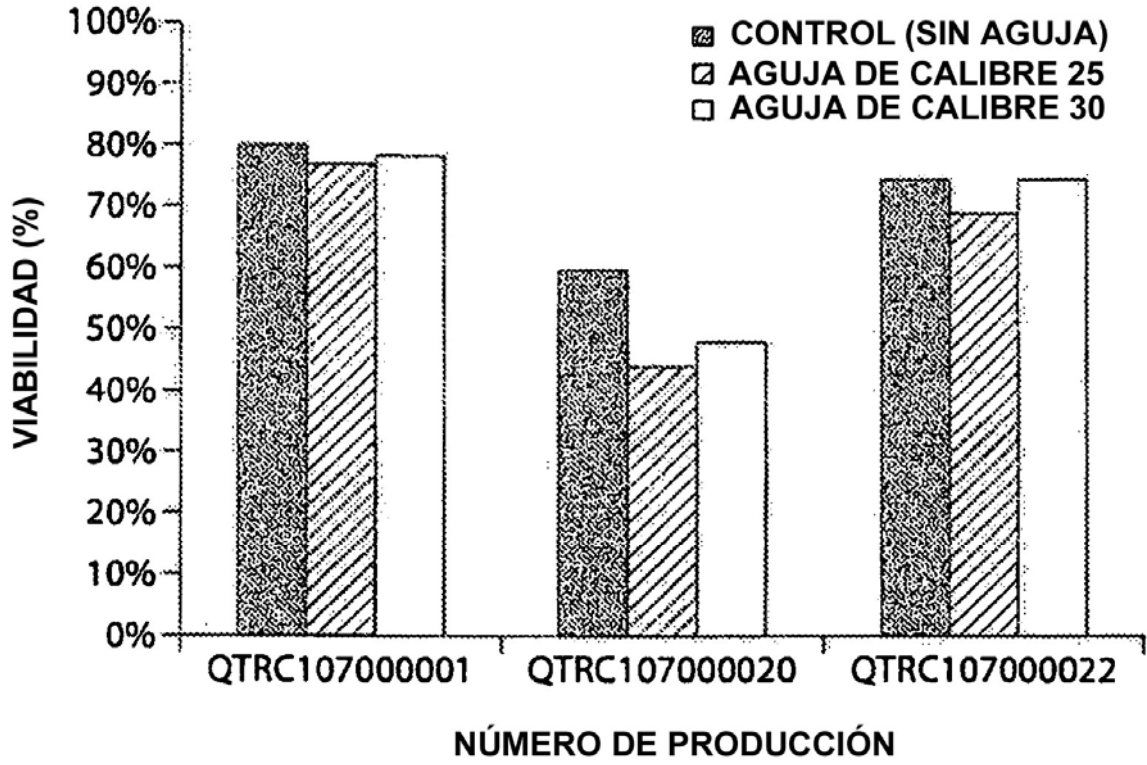


Fig. 18

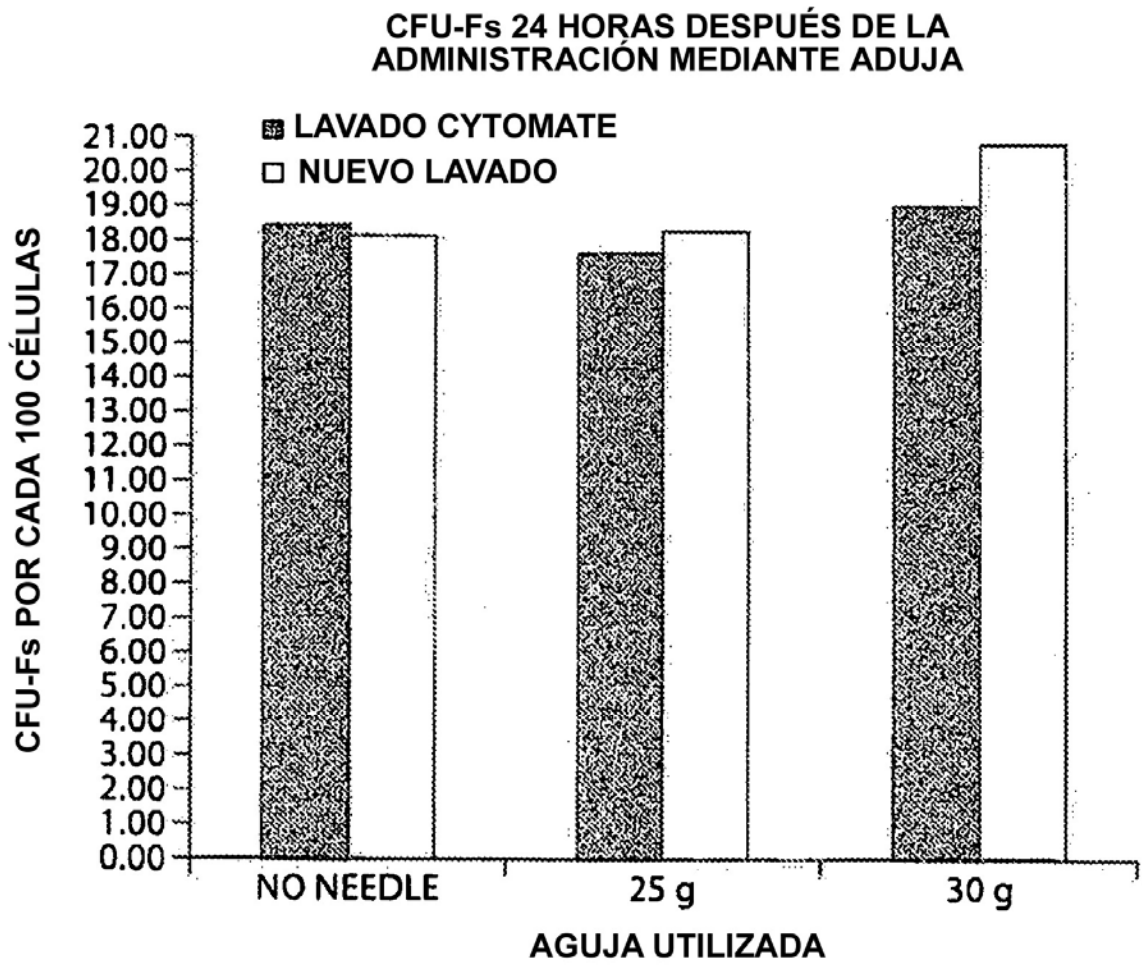


Fig. 19

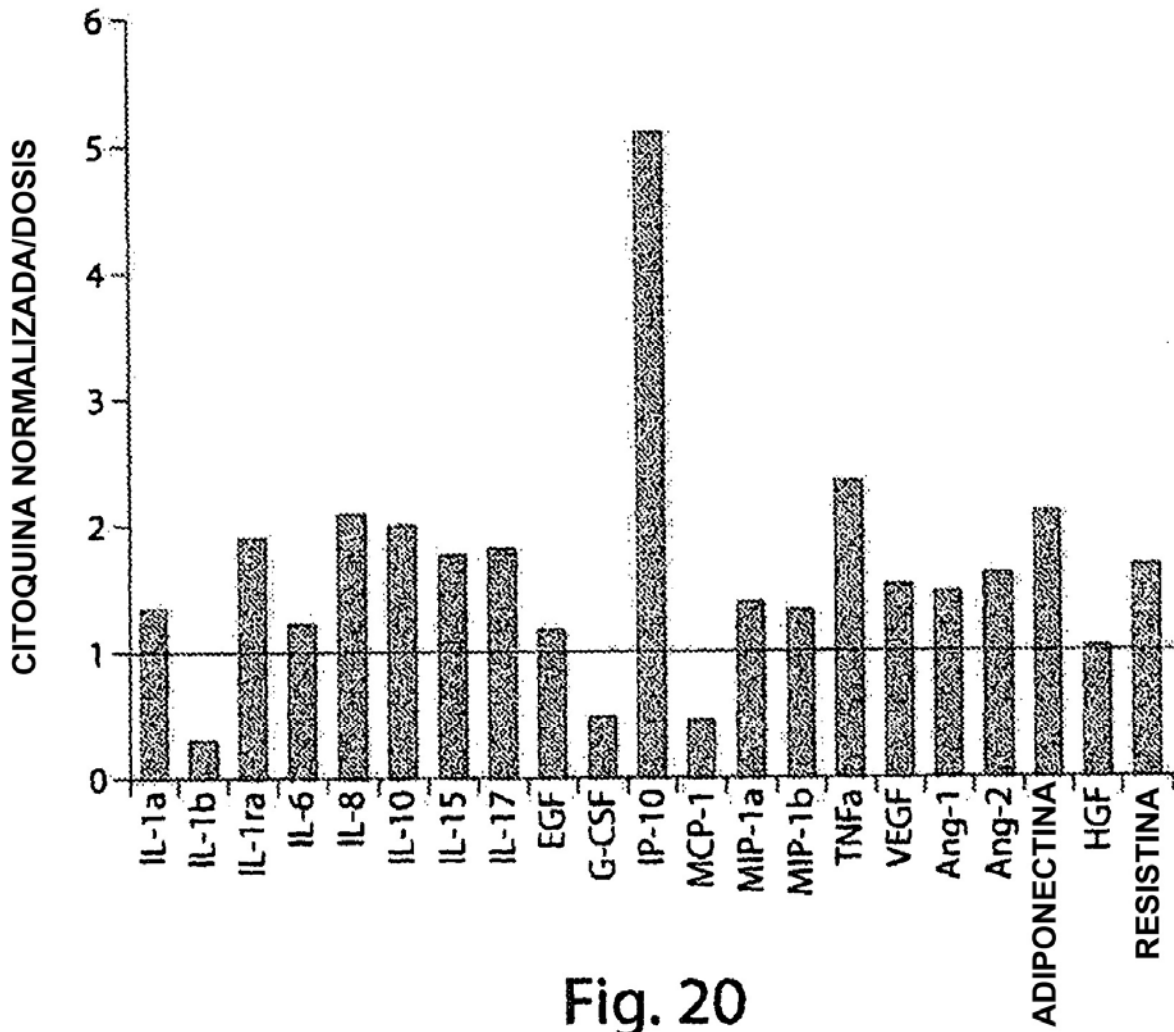


Fig. 20

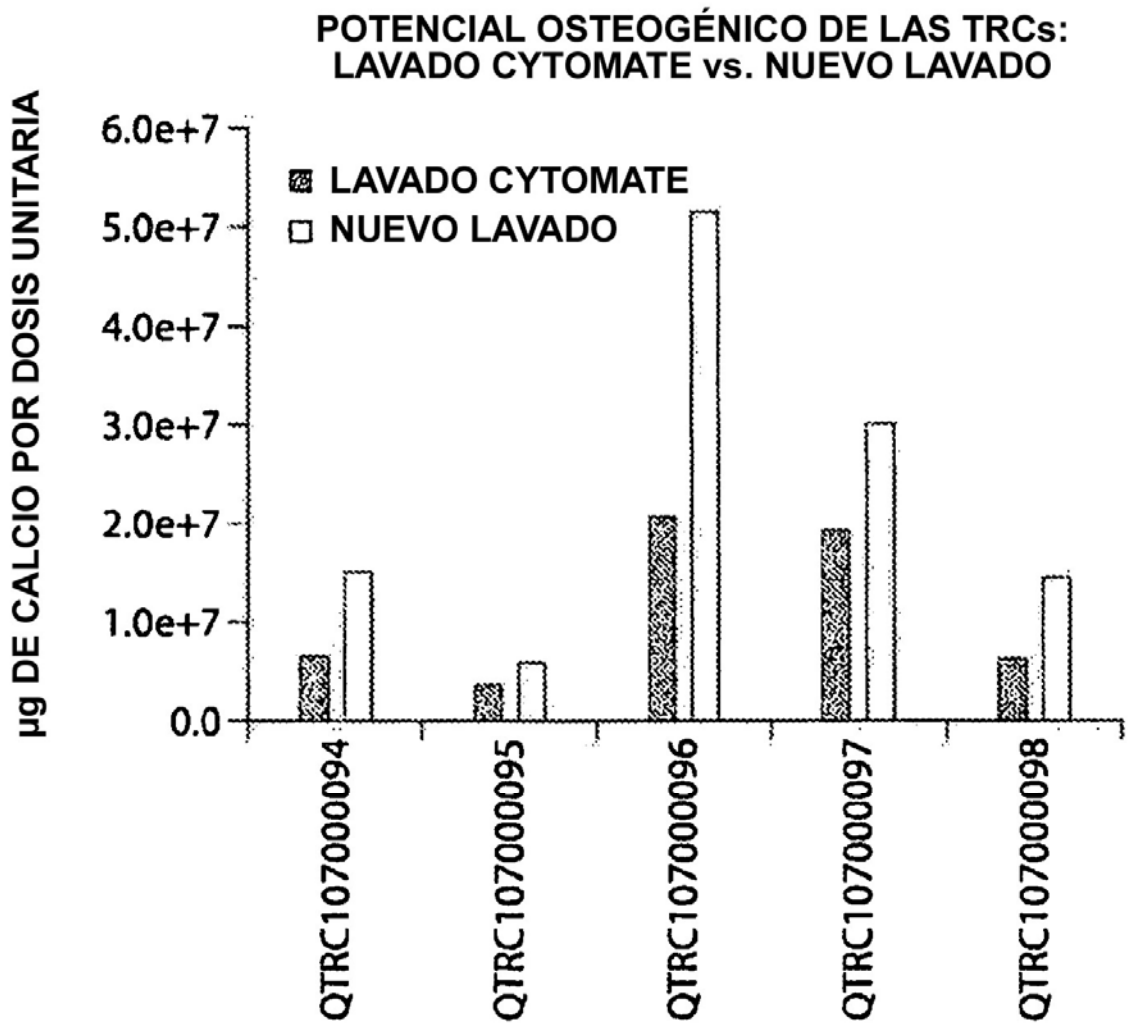


Fig. 21

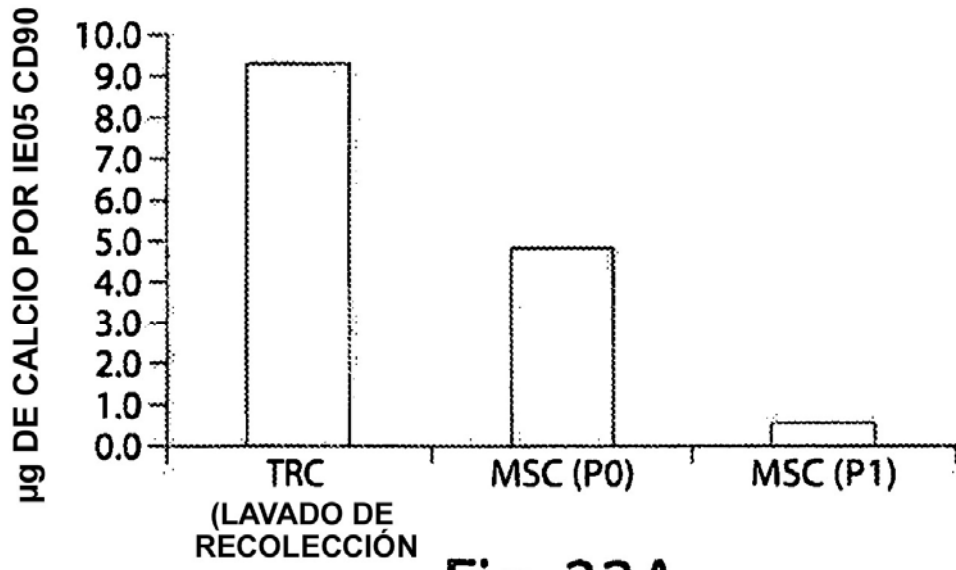


Fig. 22A

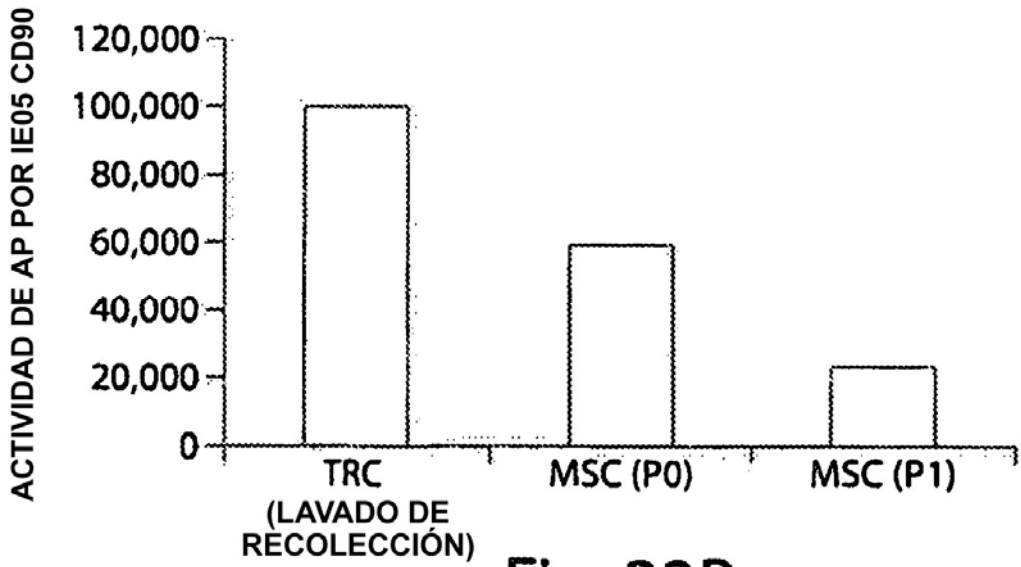


Fig. 22B

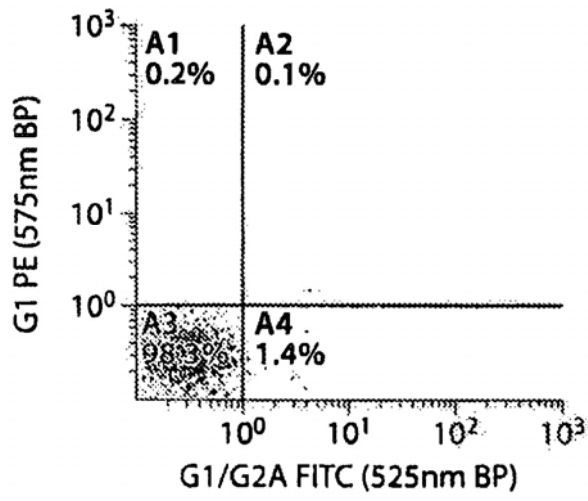


Fig. 23A

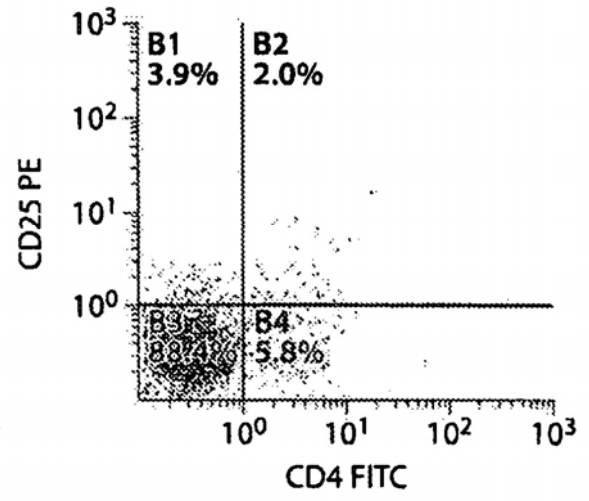


Fig. 23B

SECRECIÓN DE CITOQUINAS POR PARTE DE TRCs TRAS LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-CD3

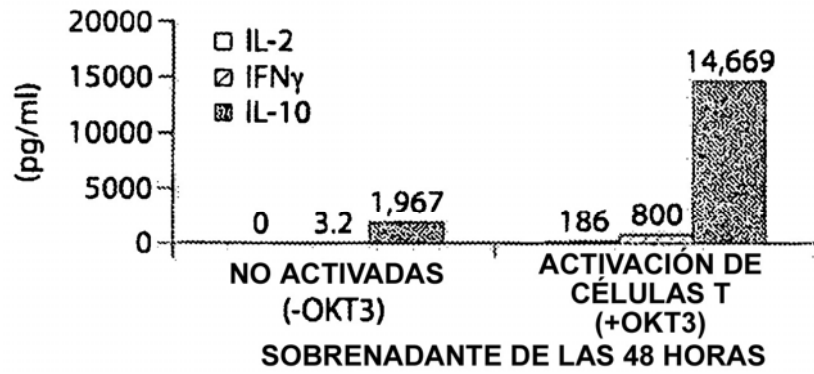


Fig. 23C

ABUNDANCIA RELATIVA DE ARNm DE IDO:
COMPARACIÓN ENTRE CYTOMATE Y LAVADO-RECOLECCIÓN

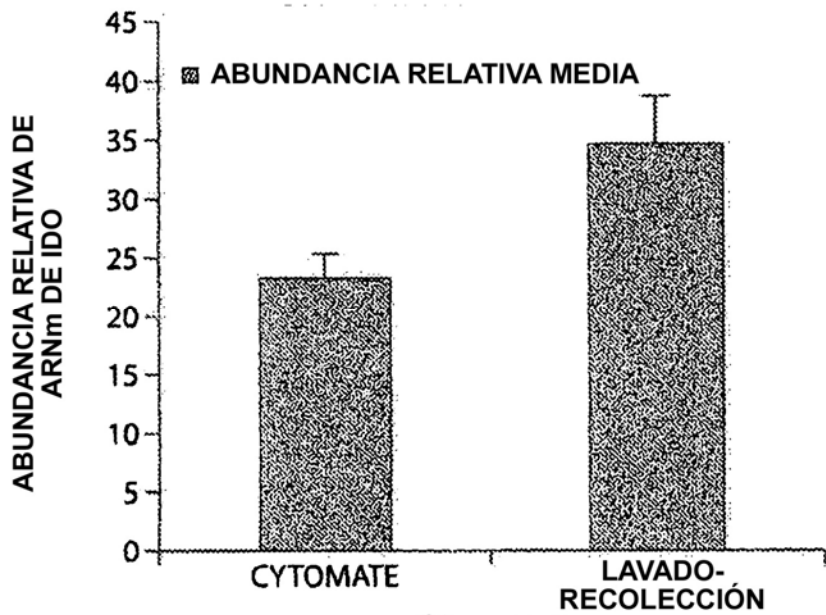


Fig. 24

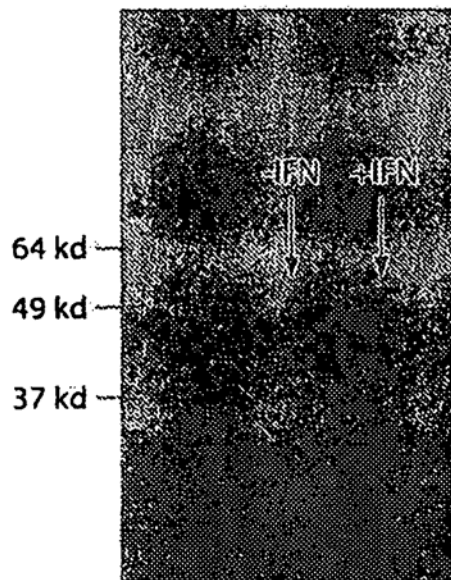


Fig. 25

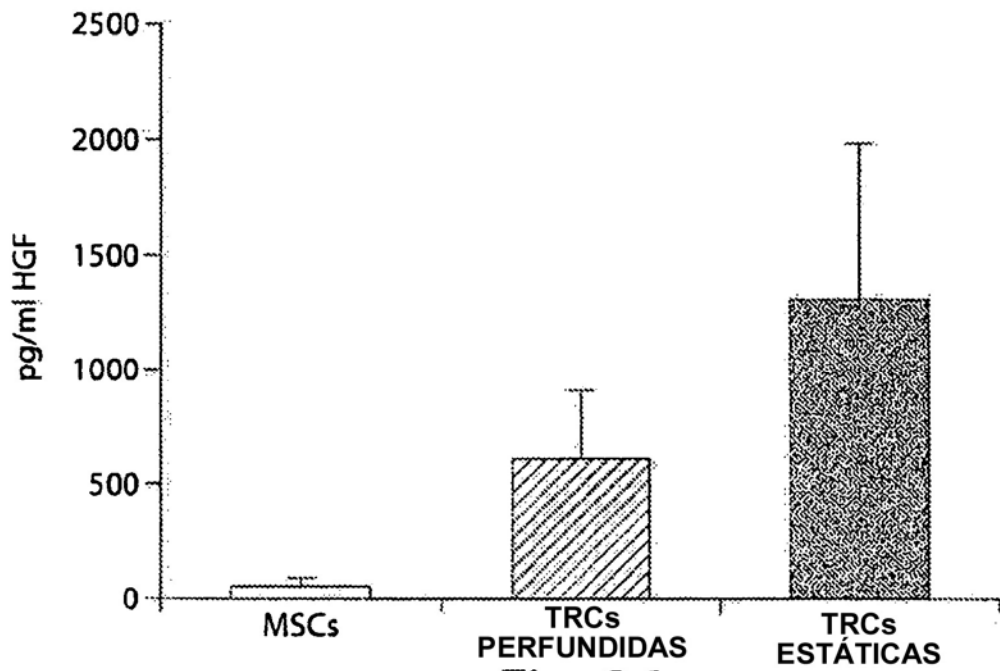


Fig. 26

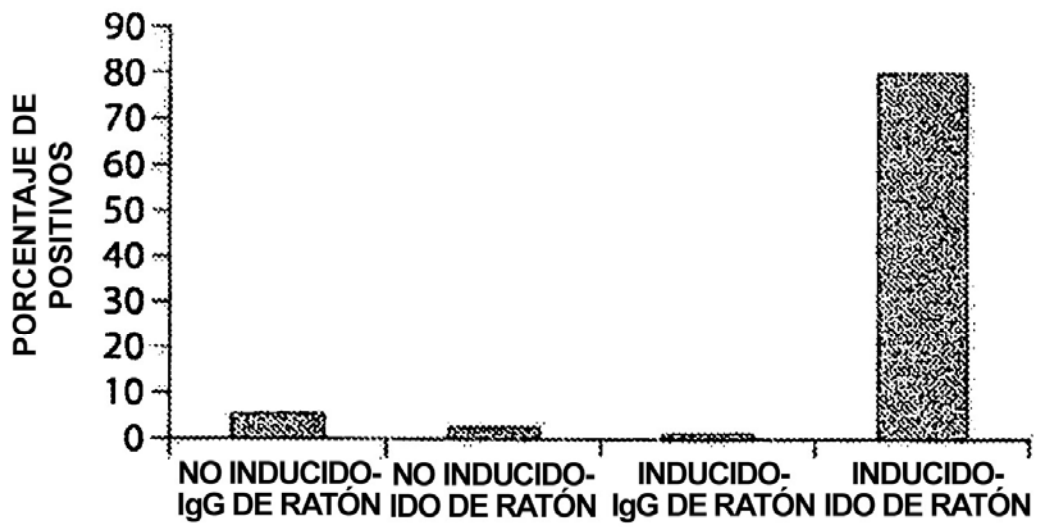


Fig. 27

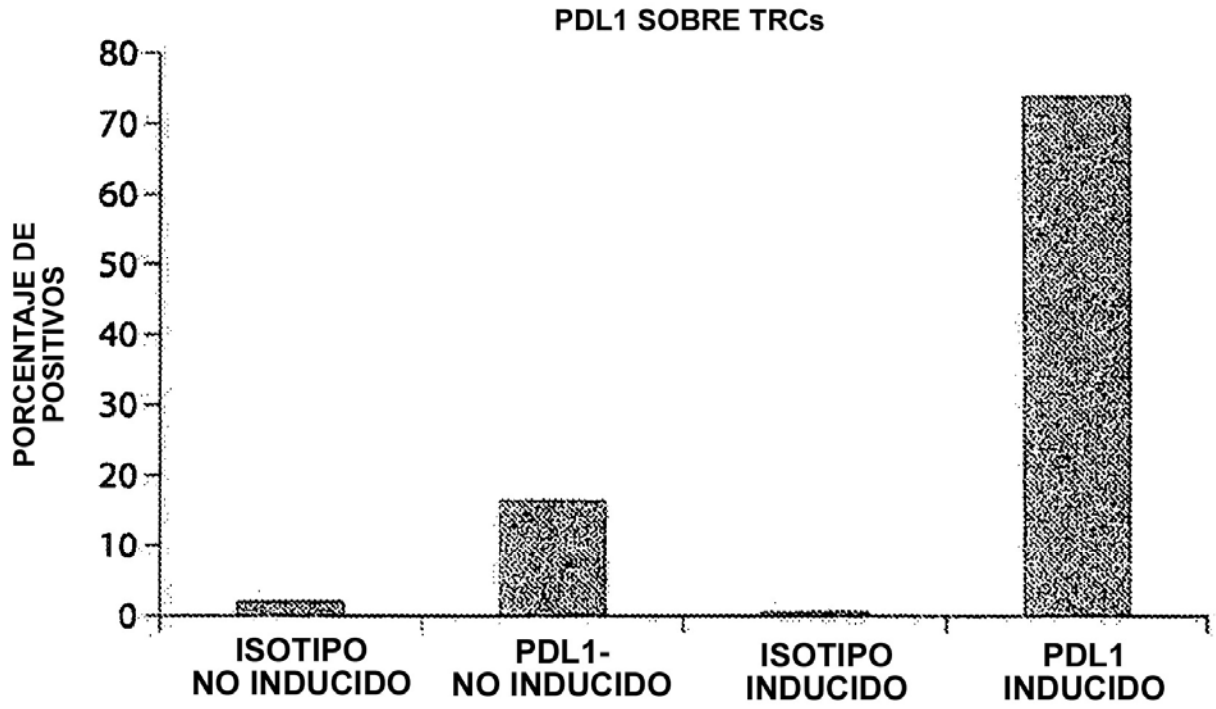


Fig. 28

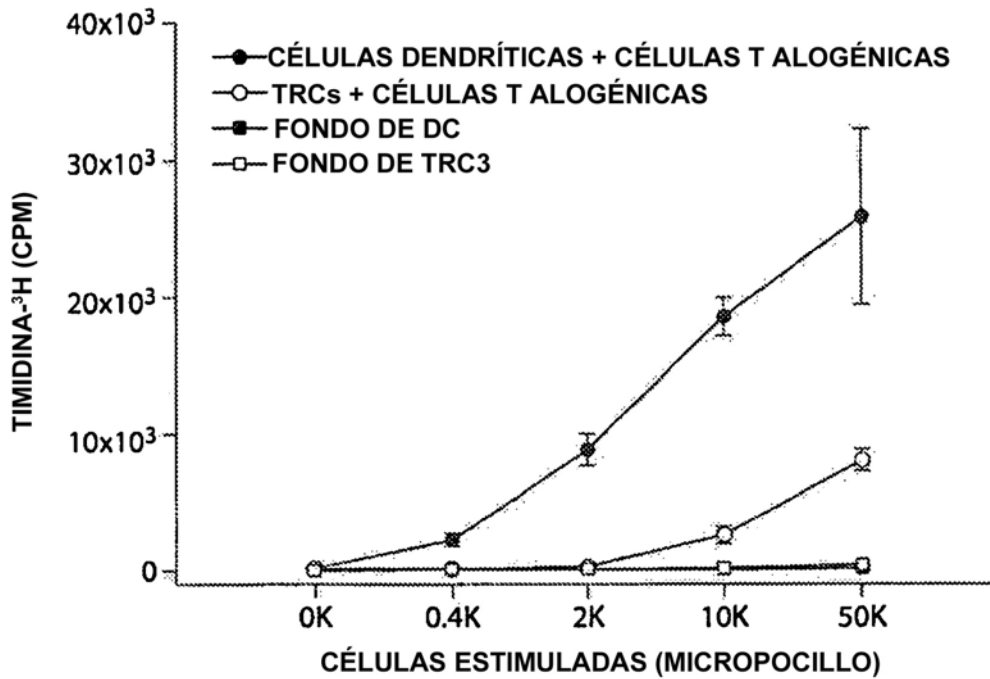


Fig. 29A

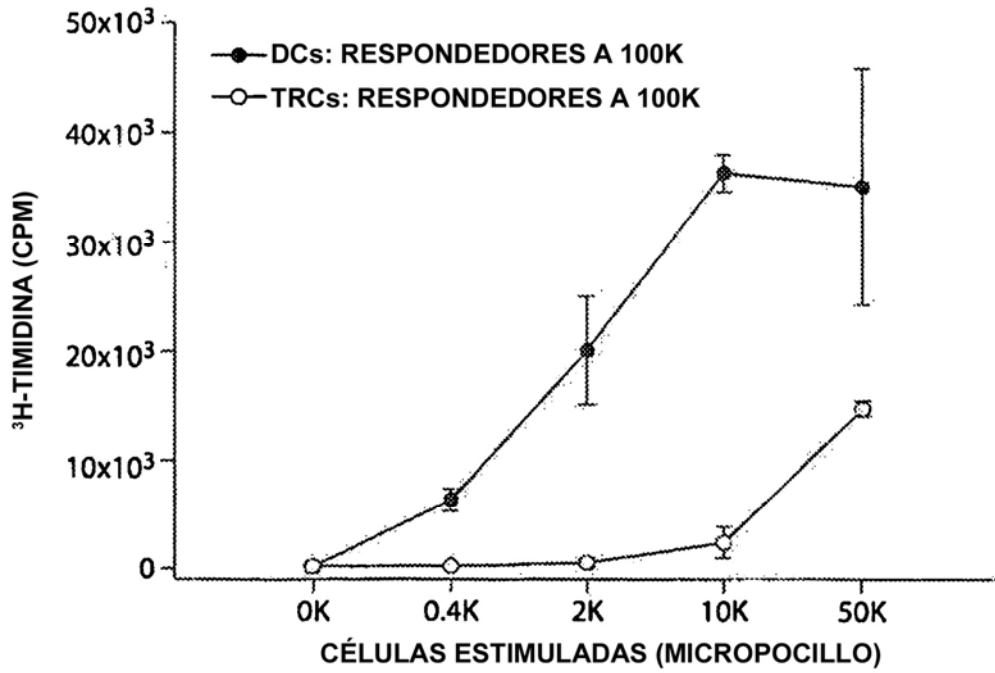


Fig. 29B

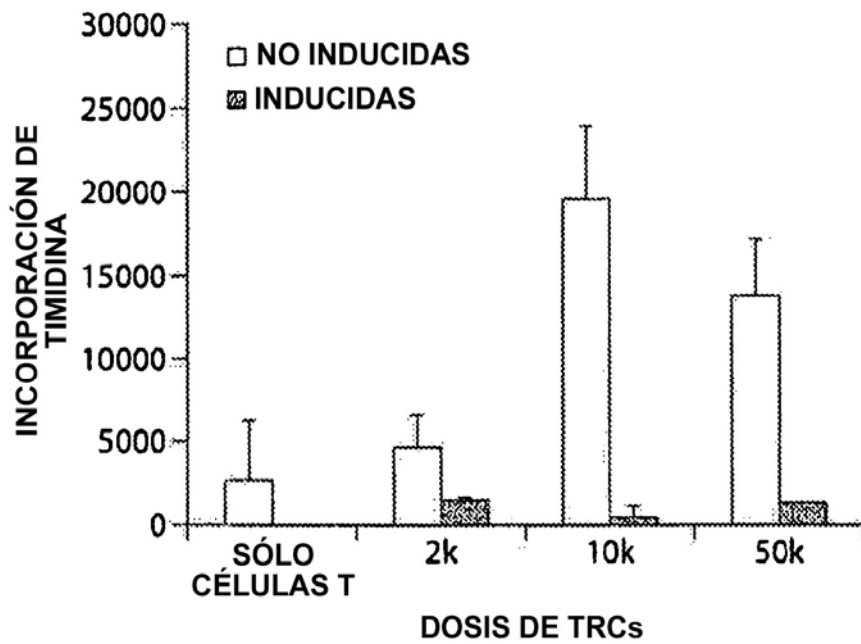


Fig. 30

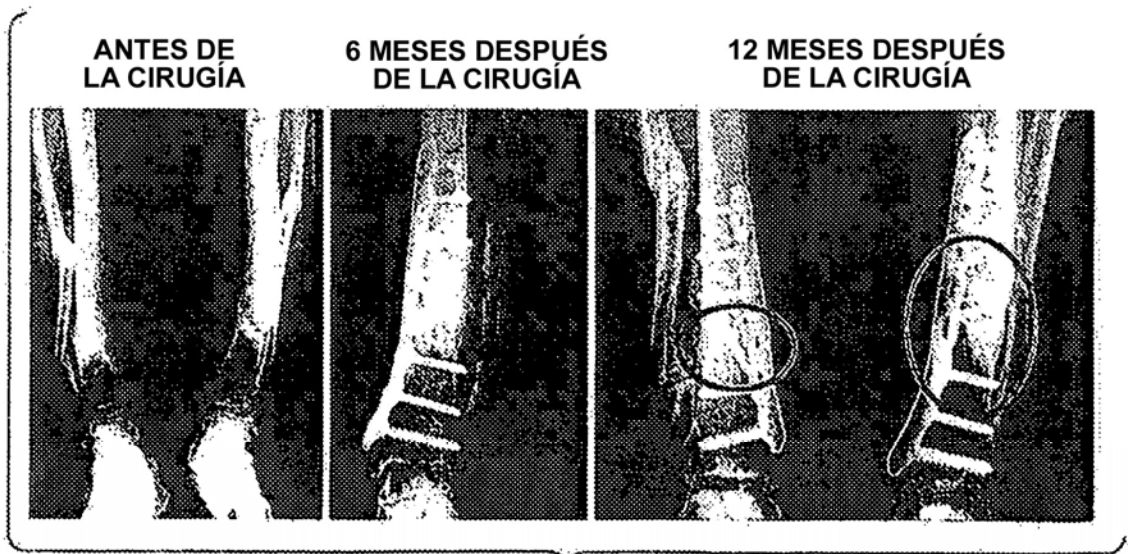


Fig. 31



Fig. 32A

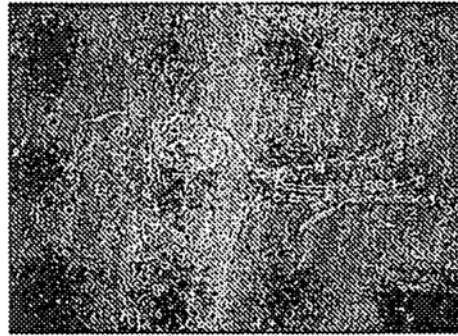


Fig. 32B

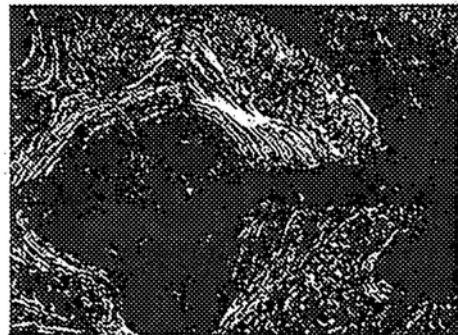


Fig. 32C



Fig. 33A

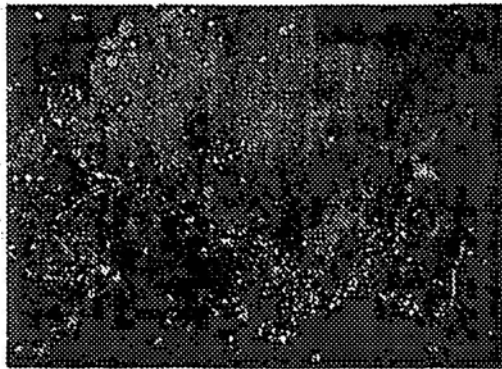


Fig. 33B

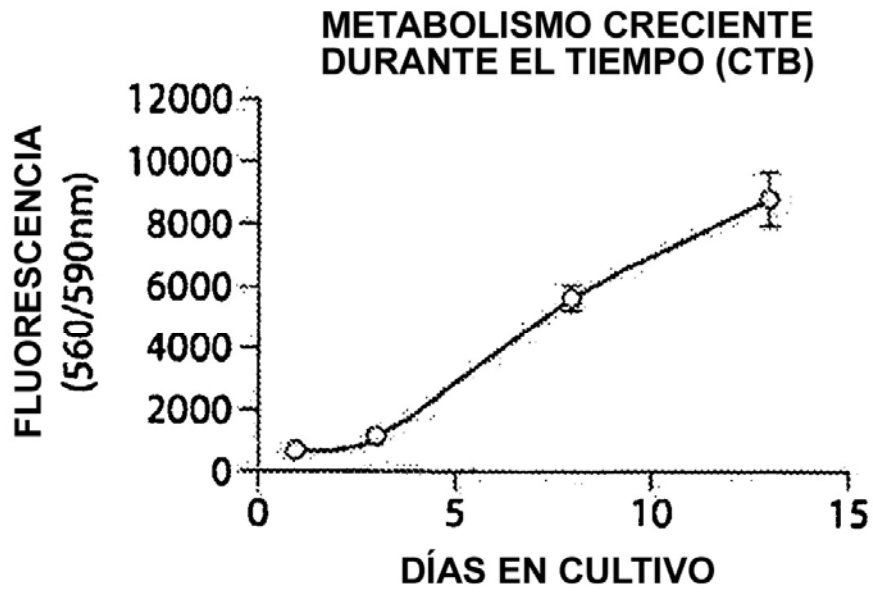


Fig. 34A



Fig. 34B

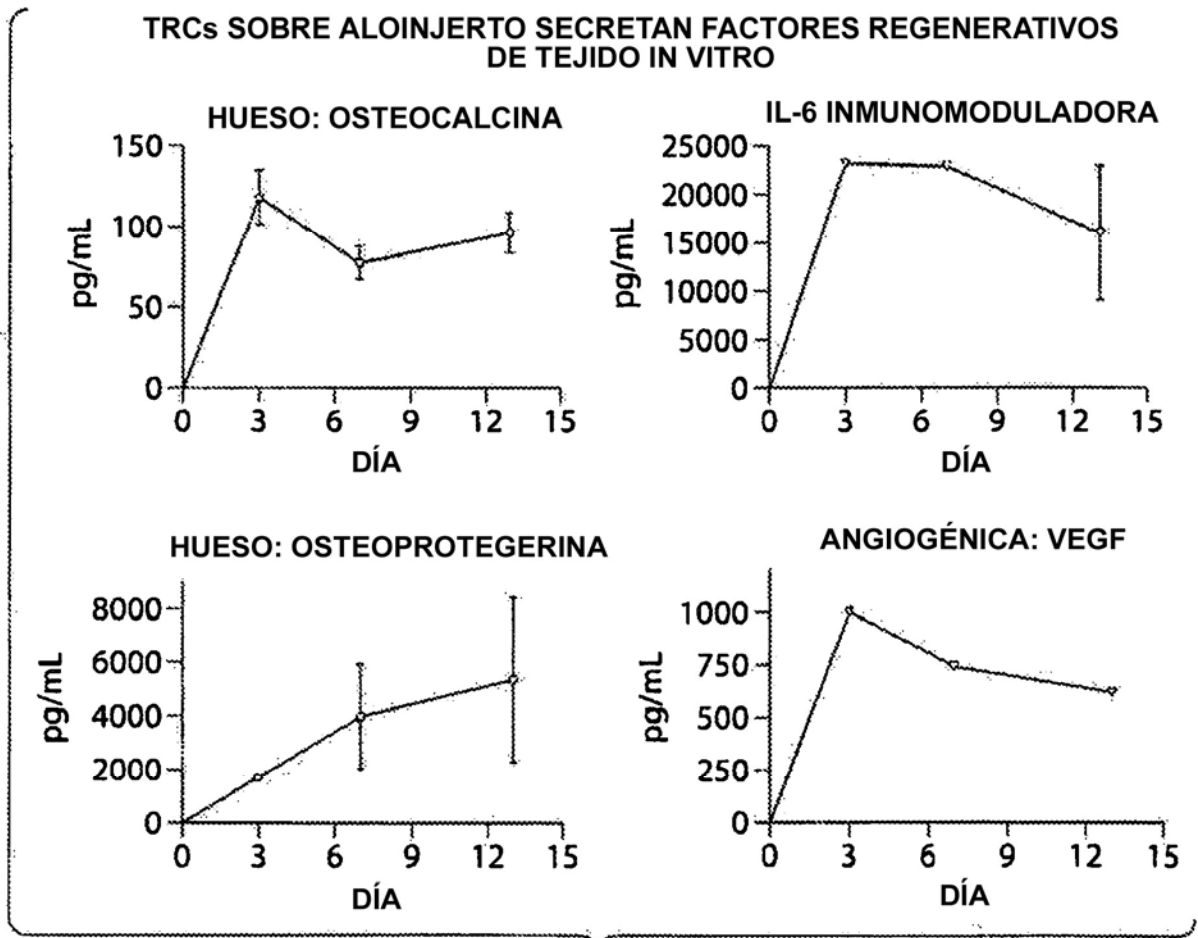


Fig. 35

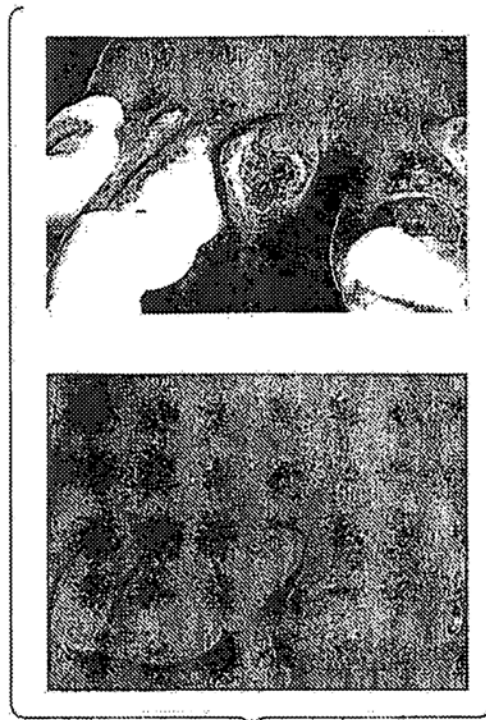


Fig. 36

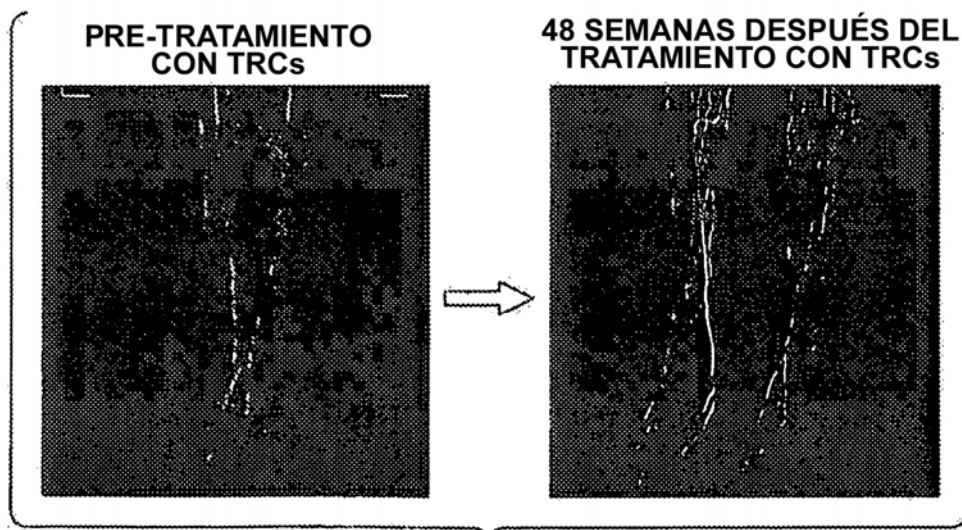


Fig. 37

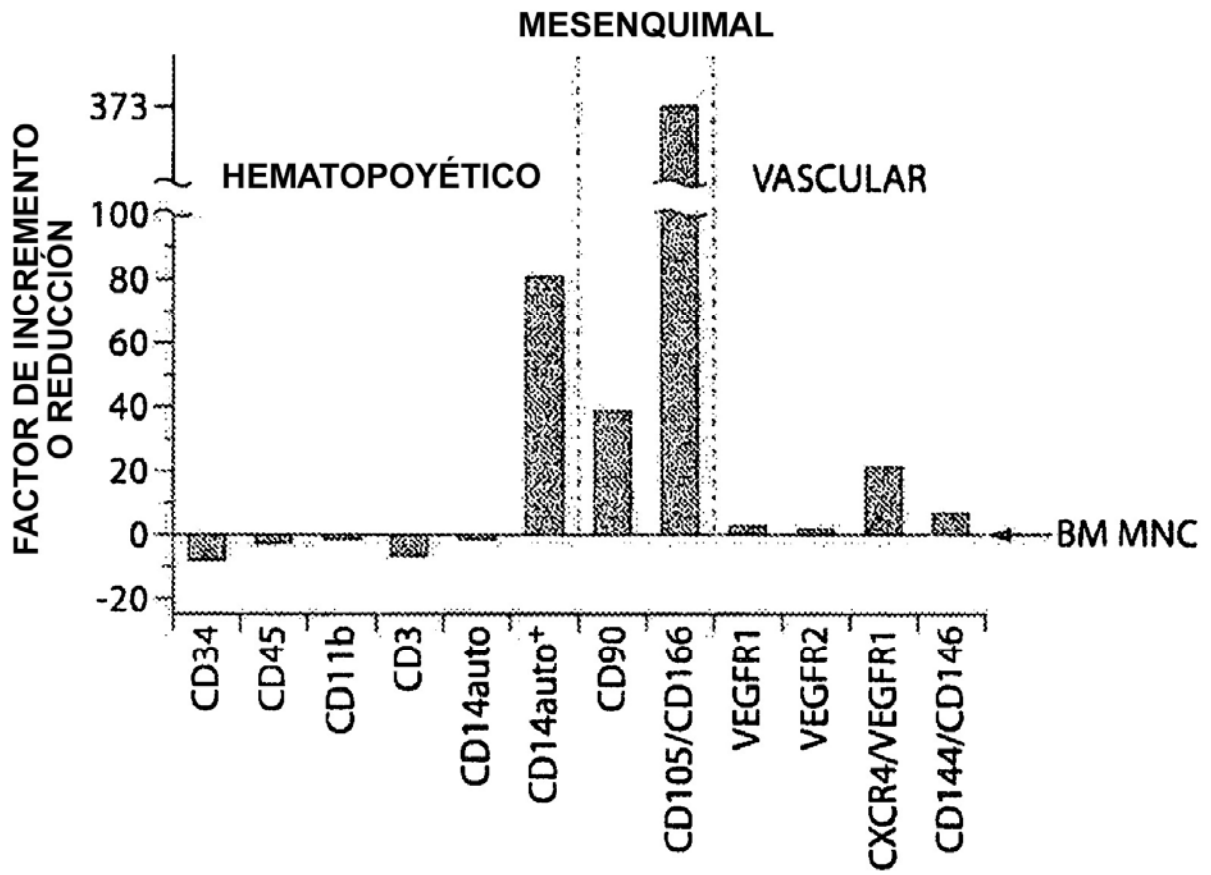


Fig. 38

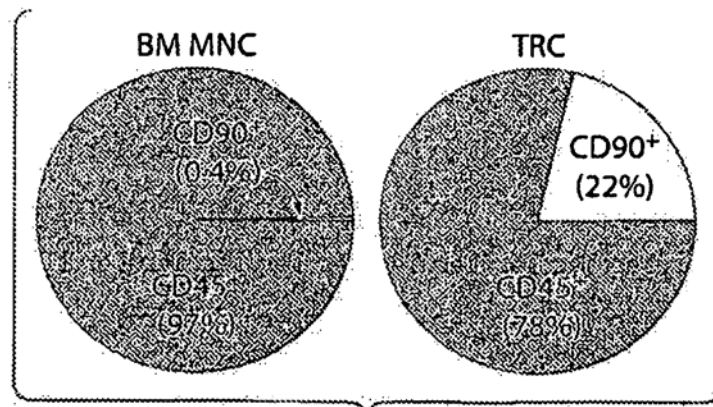


Fig. 39

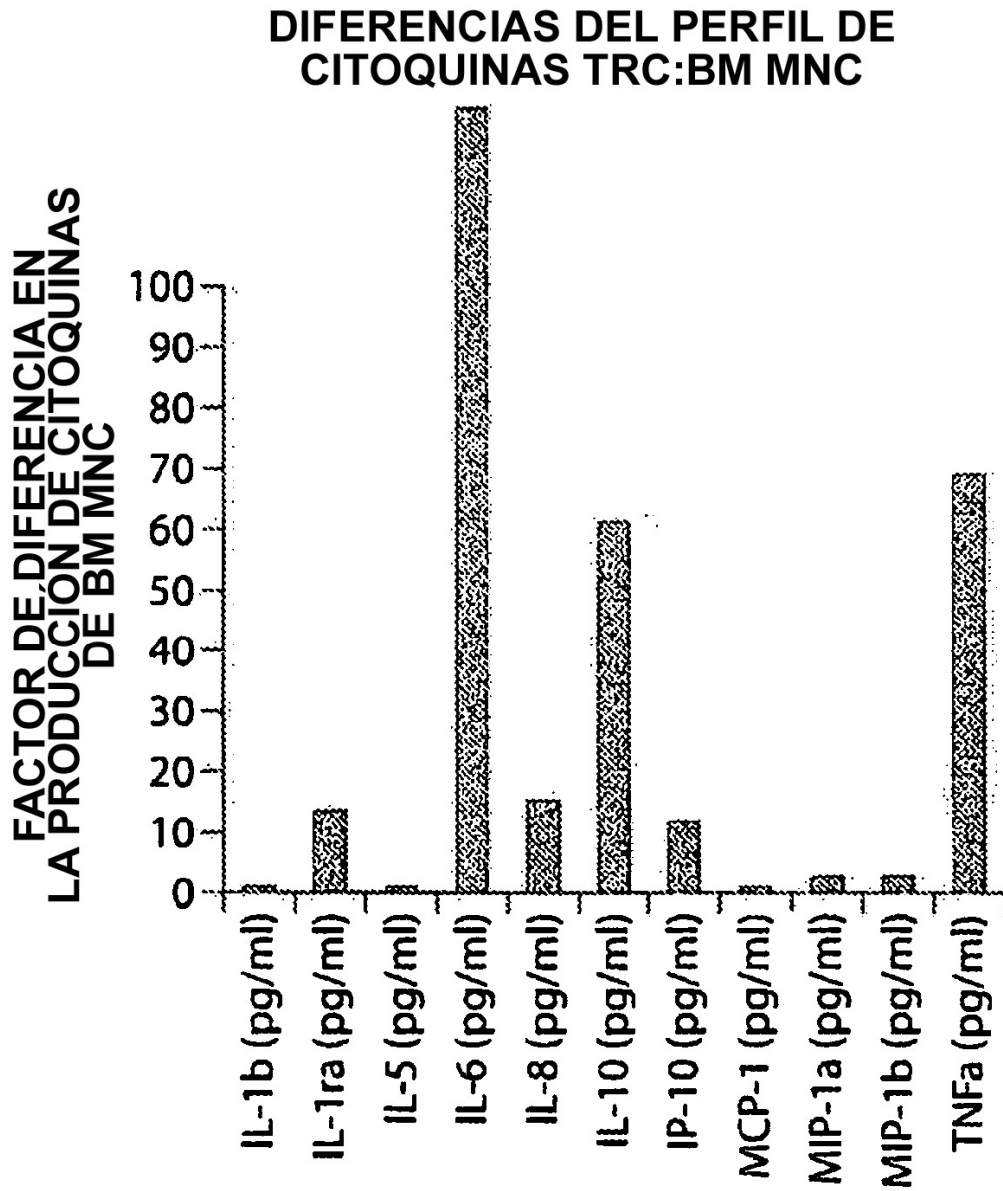


Fig. 40

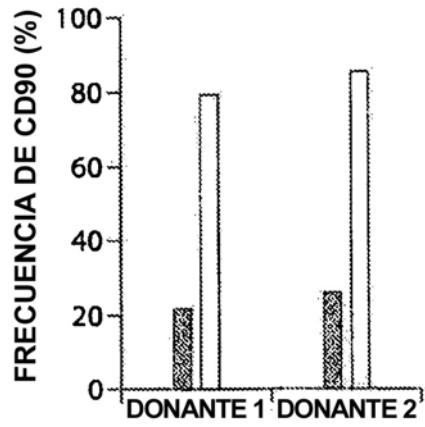


Fig. 41A

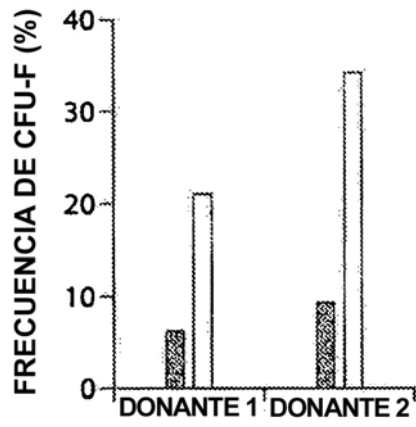


Fig. 41B

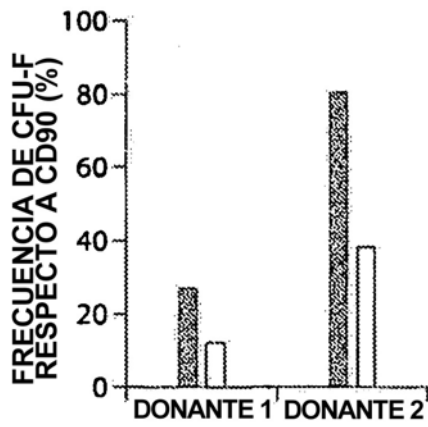


Fig. 41C

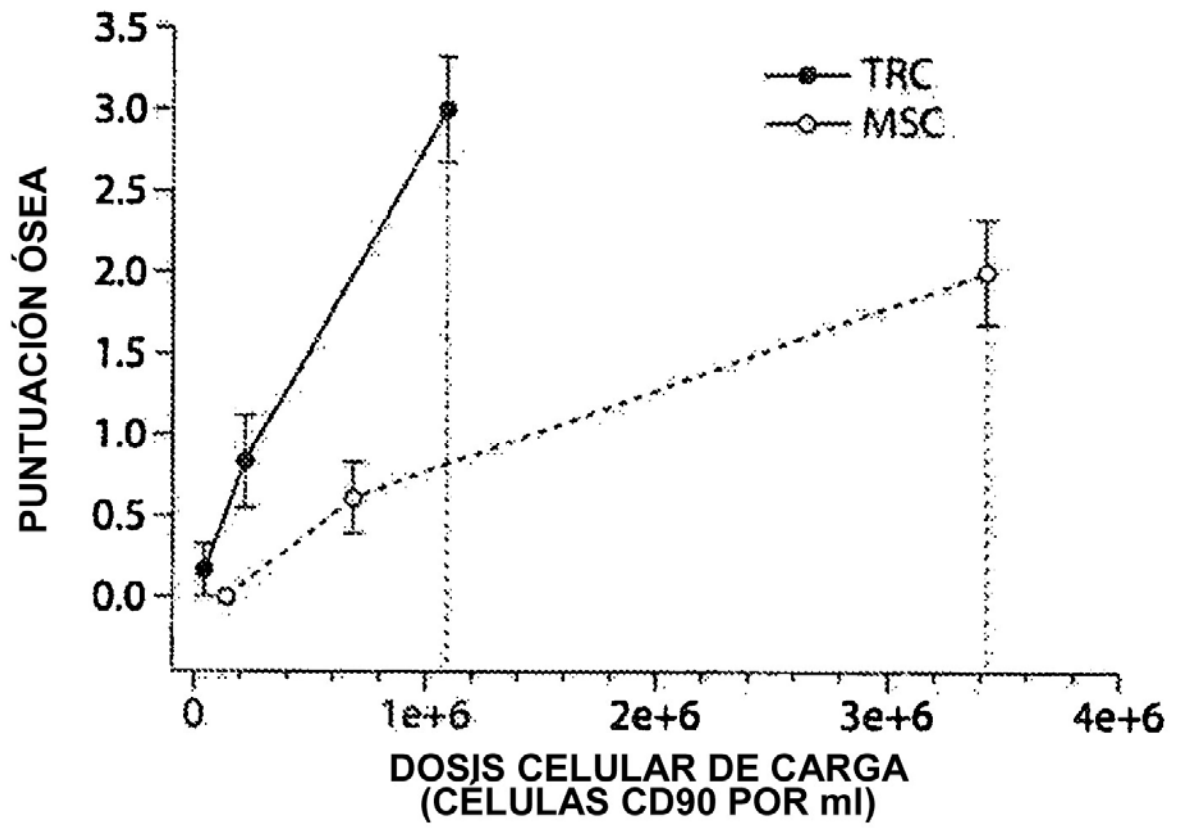


Fig. 42