

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 816**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28	(2006.01)	A61K 47/18	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)	A61K 47/20	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	A61K 47/26	(2006.01)
A61P 25/02	(2006.01)	A61K 47/42	(2006.01)
A61K 9/10	(2006.01)	A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/38	(2006.01)		
A61K 9/08	(2006.01)		
A61K 31/10	(2006.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 47/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2008 E 08753410 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2162141**

54 Título: **Composición para tratar la isquemia de las extremidades que comprende células madre procedentes de tejido adiposo**

30 Prioridad:

25.05.2007 KR 20070050624

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

28.11.2013

73 Titular/es:

**RNL BIO CO., LTD. (100.0%)
1596-7 Bongcheon-dong Gwanak-gu
Seoul 151-050, KR**

72 Inventor/es:

**RA, JEONG CHAN;
HAN, HAE JUNG;
LEE, HANG YOUNG y
KIM, HYO EUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 431 816 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para tratar la isquemia de las extremidades que comprende células madre procedentes de tejido adiposo.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas celulares y más en particular a composiciones terapéuticas celulares para uso para tratar isquemias, en la que las composiciones contienen células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo y excipientes.

Técnica anterior

- 10 Las isquemias de las extremidades incluyen pie diabético, que muestra trastorno circulatorio periférico causado por oclusión de las arterias o venas debido a trombosis intravascular, embolia, inflamación intravascular, hipertensión, hiperlipidemia y complicaciones diabéticas, síntomas que tienen lugar en las extremidades debido a lesión de los vasos sanguíneos causada por factores externos, tales como quemaduras o sabañones, enfermedad de Buerger que aparece como inflamación vascular y trombosis en hombres de mediana edad que son grandes fumadores, ejemplos típicos de los cuales son arteriosclerosis obliterante, tromboangitis obliterante y similares.

- 15 Los métodos actuales para tratar dichas enfermedades incluyen tratar preferentemente las enfermedades que causan trombosis o embolia, por ejemplo, arritmia, mixoma auricular y eritrocitosis y síntomas de alivio temporal usando agentes trombolíticos o administrando un vasodilatador y un agente mejorador de la circulación, etc. para aumentar el diámetro luminal, por ejemplo, dextrano, anticoagulantes, fenilbutazona, persantin, hormonas de la corteza adrenal, agentes inmunosupresores o prostaglandina E1.

- 20 Los métodos de tratamiento quirúrgico incluyen un método para eliminar los dolores en las áreas isquémicas por simpatectomía, bloqueo epidural y bloqueo simpático, un método para aliviar el excesivo tono simpático para inducir el efecto de mejorar la vasodilatación y la circulación sanguínea, endarterectomía, cirugía de injerto de derivación usando vasos sanguíneos artificiales tales como Gortex y lesionectomía.

- 25 Sin embargo, los métodos de tratamiento con fármacos descritos anteriormente o tratamiento quirúrgico presentan problemas por que alivian temporalmente los síntomas de la isquemia o muestran un alto riesgo de reaparición. Por esta razón, hay una necesidad de desarrollar un método capaz de tratar de manera fundamental las isquemias.

Células madre se refiere a células que no sólo presentan capacidad de autoreplicación sino también la capacidad de diferenciarse en al menos dos células y se pueden dividir en células madre totipotentes, células madre pluripotentes y células madre multipotentes.

- 30 Recientemente, se encontró que el tejido adiposo era una nueva fuente de células madre multipotentes (Cousin et al, *BBRC*, 301:1.016, 2.003; Miranville et al., *Circulation*, 110: 349, 2.004; Gronthos et al, *J. Cell Physiol.*, 189: 54, 2.001; Seo et al, *BBRC*, 328: 258, 2.005). Es decir, se indicó que un grupo de células no diferenciadas se incluye en el tejido adiposo humano obtenido por liposucción y presenta la capacidad de diferenciarse en células grasas, células osteogénicas, mioblastos y condroblastos (Zuk et al, *Tissue Eng.*, 7: 211, 2.001; Rodriguez et al, *BBRC*, 315: 255, 2.004). Este tejido adiposo presenta una ventaja por que se puede extraer en grandes cantidades, se puede hacer proliferar en grandes cantidades por cultivo de tejido y se puede inyectar repetidamente puesto que es tejido autólogo de manera que no hay riesgo de reacción de inmunorechazo. Por lo tanto, recibe atención como una nueva fuente de células madre, que supera las deficiencias existentes de células madre procedentes de médula ósea o sangre del cordón umbilical, tales como dificultades en la recogida de las mismas, alto coste y que se tiene que encontrar una correspondencia adecuada por la verificación de la compatibilidad de los tejidos.

También, recientes estudios usando experimentos en modelos animales indican que las células procedentes de tejido adiposo presentan las capacidades para regenerar músculos y estimular la diferenciación de los vasos sanguíneos nerviosos. Así, estas células procedentes de tejido adiposo encuentran atención como una nueva fuente de células madre.

- 45 Las células madre procedentes de tejido adiposo conocidas hasta ahora incluyen células madre adultas de procedencia adiposa, humanas, que pueden diferenciarse en células epiteliales (Brzoska et al, *BBRC*, 330: 142, 2.005), células madre adultas de procedencia adiposa, humanas, que pueden diferenciarse en células osteogénicas y grasas (Cao et al., *BBRC*, 332: 370, 2.005), células madre adultas de procedencia adiposa, humanas, que pueden diferenciarse en células nerviosas (Safford et al., *BBRC*, 294: 371, 2.002), células madre de procedencia adiposa de ratas que pueden diferenciarse en células grasas (Ogawa et al., *BBRC*, 319: 511, 2.004), células madre de procedencia adiposa de ratas que pueden diferenciarse en células osteogénicas y condrogénicas (Ogawa et al, *BBRC*, 313: 871, 2.004), células madre de procedencia adiposa, humanas, que pueden diferenciarse en células de cartílago (*Biomaterials*, 25: 3.211, 2.004), células madre de procedencia adiposa de rata que pueden diferenciarse en células nerviosas (Fujimura et al, *BBRC*, 333: 116, 2.005) y células madre de procedencia adiposa que pueden diferenciarse en células óseas, células de cartílago, células nerviosas o células musculares (patente de EE.UU. 6.777.231).

5 El documento de patente internacional WO 2006/134951 desvela una célula madre de procedencia grasa aislada de un aspirado de grasa y una caracterización de dicha célula madre. Además se desvela un método de cultivo para una célula madre no diferenciada o una célula madre pluripotente cultivada, especialmente un cultivo a largo plazo para una célula madre de procedencia grasa. Se desvela además el tratamiento de isquemia por administración de células madre de procedencia adiposa.

El documento de patente internacional WO 2006/136244 desvela métodos y composiciones que utilizan células estromales de procedencia adiposa para tratar fístulas. Además se desvelan portadores adecuados para células madre estromales procedentes de tejido adiposo incluyendo azúcares y polioles.

10 El documento de patente internacional WO 03/059272 desvela un método para multiplicar la producción de factores que inducen angiogénesis y vasculogénesis segregados por exposición de células madre a, y co-cultivo de, las células madre con un compuesto para aumentar la producción de factores que inducen angiogénesis y vasculogénesis. Además se desvela una terapéutica para uso en la inducción de angiogénesis y vasculogénesis, incluyendo la terapéutica factores que inducen angiogénesis y vasculogénesis aislados de células madre junto con un tratamiento de células farmacéuticamente aceptable.

15 En intentos por tratar isquemias, la Publicación de Patente Coreana N° 2003-0034177 desvela un método para tratar isquemias usando células madre hematopoyéticas cuya diferenciación ha sido inducida por G-CSF y la Publicación de Patente Coreana N° 2005-0111593 desvela un método para tratar isquemias usando células madre mesenquimales con un gen de angiopoietina introducido en las mismas. Sin embargo, los métodos previos presentan problemas por que las células madre se usan de manera auxiliar o por que el almacenaje de agentes terapéuticos celulares que comprenden células madre no es estable.

20 De acuerdo con esto, los presentes autores han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un método para tratar isquemias usando células madre más estables y, como resultado, han encontrado que, cuando las células madre adiposas proceden de tejido adiposo, al que se ha añadido un excipiente tal como sacarosa, se introducen en un modelo de ratón de isquemia, se producen de manera eficaz nuevos vasos sanguíneos, completando de ese modo la presente invención.

Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones terapéuticas celulares para uso para tratar isquemias, que contienen células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo como ingredientes activos y muestran alta estabilidad durante almacenaje en frío o congelado.

30 Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición terapéutica celular que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina, sacarosa al 2%, albúmina al 5% y AEDT 1 mM. La invención además proporciona una composición terapéutica celular, que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina, sacarosa al 2%, albúmina al 2% y AEDT 10 mM. La invención además proporciona una composición terapéutica celular, que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina, sacarosa al 2%, albúmina al 5% y DMSO al 10%. Las composiciones terapéuticas celulares anteriores según la presente invención se proporcionan para uso para tratar isquemias.

35 En la presente invención, una base para la composición se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en disolución salina fisiológica, disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y Hartman-D®.

En la presente invención, la composición contiene sacarosa y albúmina como excipiente. Además, la composición contiene AEDT o DMSO como excipiente.

45 En la presente invención, las composiciones comprenden adicionalmente preferiblemente una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en: agentes de suspensión, agentes solubilizantes, estabilizantes, agentes isotónicos, conservantes, agentes que previenen la adsorción, tensioactivos, diluyentes, vehículos, agentes de ajuste del pH, agentes analgésicos, agentes tampón, agentes reductores que contienen azufre y antioxidantes.

Otras características y realizaciones de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

50 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra fotografías tomadas a un aumento de x100 para las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, según la presente invención.

La FIG. 2 muestra características inmunológicas de las células madre multipotentes de procedencia adiposa, humanas, según la presente invención.

La FIG. 3 muestra la estabilidad de las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, según la presente invención relativa a capacidad de formación de esferas.

La FIG. 4 muestra resultados de ensayo para la capacidad angiogénica *in vitro* de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, humanas, según la presente invención.

5 La FIG. 5 muestra el grado de eliminación de las extremidades en ratones desnudos con una isquemia de las extremidades inferiores inducida y se les inyectaron diversas concentraciones de las células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, humanas, inventivas, y muestra el grado de angiogénesis en los ratones desnudos, observada usando formación de imágenes de perfusión de láser Doppler.

10 La FIG. 6 muestra la capacidad aniogénica de las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, expresada como proporción de perfusión de láser Doppler.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas.

La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas celulares y a su uso para tratar isquemias, en la que las composiciones contienen células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo a una concentración de 1×10^5 - 1×10^8 células/ml y sacarosa, albúmina y AEDT o DMSO como excipientes.

15 En la presente invención, las células madre de procedencia adiposa se obtienen de tejido adiposo recogido por liposucción y células madre mesenquimales de procedencia adiposa que se adhieren a un matraz de cultivo y crecen *in vitro*.

20 En una realización de la presente invención, las células mesenquimales procedentes de tejido adiposo se pueden obtener por infusión de una disolución tumescente y un material que contiene grasa usando tubos de liposucción o una jeringa desechable con un catéter conectado a los mismos, sometiendo los materiales resultantes a un ensayo de micoplasma y un ensayo de esterilidad, seleccionando una muestra, que pasa los patrones de gestión de la calidad, de entre los materiales ensayados, centrifugando la muestra seleccionada en una capa adiposa y una capa acuosa, pretratando la muestra de la capa acuosa con una disolución de colagenasa y cultivando después las células resultantes en un medio DMEM que contiene FBS al 10% y ácido ascórbico.

25 Mientras tanto los métodos para obtener células madre multipotentes que expresan los antígenos de superficie deseados del caldo de células madre procedentes de tejido adiposo, humanas, obtenido anteriormente incluye un método FACS usando un citómetro de flujo con función de clasificación (*Int. Immunol.*, 10 (3): 275, 1.998), un método usando perlas magnéticas y un método de planificación usando un anticuerpo que reconoce de manera específica las células madre multipotentes (*J. Immunol*, 141 (8): 2.797, 1.998). También, los métodos para obtener células madre multipotentes a partir de una gran cantidad de caldo de cultivo incluyen un método donde los anticuerpos, que se expresan en la superficie de las células para reconocer de manera específica las moléculas (de ahora en adelante, referido como "antígenos de superficie"), se usan solos o en combinación como columnas.

30 Los métodos de clasificación por citometría de flujo pueden incluir un método de carga de gotas de agua y un método de captura de células. En cualquiera de estos métodos, un anticuerpo que reconoce de manera específica a un antígeno sobre la superficie celular se marca de manera fluorescente, la intensidad de la fluorescencia emitida de un anticuerpo unido con la molécula expresada sobre la superficie de la célula se convierte en una señal eléctrica según lo cual se puede cuantificar la cantidad expresada del antígeno. También es posible separar las células que expresan una pluralidad de antígenos superficiales por combinación de tipos de fluorescencia usados de allí. Ejemplos de fluorescencias que se pueden usar en este caso incluyen (por sus siglas en inglés) FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (alo-ficocianina), TR (Rojo Texas), Cy 3, Cicromo, Rojo 613, Rojo 670, TRI-Color, Rojo Quantum, etc.

35 Los métodos FACS que usan un citómetro de flujo incluyen: un método donde se recoge el caldo de células madre anterior del que se aíslan células, por ejemplo, por centrifugación, y se tiñen directamente con anticuerpos y un método en el que las células se cultivan y crecen en un medio adecuado y después se tiñen con anticuerpos. La tinción de células se realiza por mezcla de un anticuerpo primario que reconoce un antígeno de superficie con una muestra de células diana e incubación de la mezcla sobre hielo durante 30 minutos a 1 hora. Cuando se marca de manera fluorescente el anticuerpo primario, las células se aíslan con un citómetro de flujo después de lavado. Cuando el anticuerpo primario no se marca de manera fluorescente, las células reaccionaron con el anticuerpo primario y un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente con actividad de unión al anticuerpo primario se mezcla después de lavado y se incubó sobre agua de hielo durante 30 minutos a 1 hora. Después de lavado, las células teñidas con los anticuerpos primario y secundario se aíslan con un citómetro de flujo.

También, las células madre mesenquimales aisladas según la presente invención se pueden analizar por sus propiedades inmunológicas usando citometría de flujo.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "isquemias" se refiere a anormalidad funcional, desnaturalización de tejidos o necrosis, causada por la reducción o ruptura molecular de suministro sanguíneo a los tejidos e incluye específicamente isquemias cardíacas tales como infarto agudo de miocardio y angina de pecho, isquemia de las

extremidades, lesiones asociadas a circulación alterada, lesiones traumáticas tales como amputación y fracturas. Específicamente, las isquemias en la presente invención incluyen no sólo isquemias sino también estados isquémicos que resultan de lesión o daño.

5 Las composiciones terapéuticas celulares de la presente invención se pueden introducir directamente o mediante un portador. El portador debería ser fisiológicamente aceptable y los ejemplos del mismo incluyen sustancias orgánicas, tales como biopolímeros y sustancias inorgánicas tales como hidroxapatito. Ejemplos específicos del mismo incluyen matrices de colágeno, polímeros o copolímeros de poli(ácido láctico), polímeros o copolímeros de polietilenglicol y derivados químicos de los mismos. Además, el portador puede ser una mezcla de dos o más de los materiales fisiológicamente aceptables ya descritos.

10 Las composiciones para uso de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, en uno o más sitios (por ejemplo, 2-50 sitios) en el músculo superviviente (músculo esquelético, músculo cardíaco, etc.) que rodea el sitio isquémico. La dosis de la composición está preferiblemente en el intervalo de, por ejemplo, $1,0 \times 10^5$ - $1,0 \times 10^8$ células/kg (peso) y más preferiblemente $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$ células/kg (peso).

15 Sin embargo, la dosis de las composiciones puede variar dependiendo del peso, edad, sexo y síntomas del paciente, la forma farmacéutica de la composición que se tiene que administrar, un método para administrar la composición, etc. Los expertos en la materia pueden ajustar la dosis de manera apropiada. La frecuencia de administración puede oscilar de una a varias veces dentro de los límites clínicamente aceptables de efectos secundarios. Puede haber uno o más sitios de administración. La dosis por kg para animales no seres humanos puede ser la misma que la de para seres humanos o se puede convertir a partir de la dosis ya descrita, por ejemplo, basándose en la relación de volumen (por ejemplo, valor promedio) entre los órganos isquémicos (tal como corazón) del ser humano e individuos animales. Los animales que se tienen que tratar según la presente invención incluyen ser humano y otros mamíferos deseados, ejemplos específicos de los cuales incluyen seres humanos, monos, ratones, ratas, conejos, ovejas, vacas y perros.

25 El uso terapéutico de la presente invención se puede conducir solo o junto con otros métodos clásicos o avanzados. Por ejemplo, el uso inventivo para tratar isquemias se puede usar preferiblemente junto con revascularización quirúrgica, tal como angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA, por sus siglas en inglés) y/o injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG, por sus siglas en inglés). El uso del uso inventivo junto con otros métodos puede mejorar de manera activa las funciones cardíacas y reducir el periodo de estar confinado a estar en la cama.

30 Las composiciones terapéuticas celulares de la presente invención pueden comprender portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de los mismos incluyen agua esterilizada, disolución salina fisiológica, un tampón clásico (por ej., ácido fosfórico, ácido cítrico u otros ácidos orgánicos), un estabilizante, sal, un antioxidante (por ej., ácido ascórbico), un tensioactivo, un agente de suspensión, un agente isotónico o un conservante. Para administración local, las composiciones de la presente invención se combinan preferiblemente con una sustancia orgánica tal como biopolímero, una sustancia inorgánica tal como hidroxapatito, ejemplos específicos de las cuales incluyen matriz de colágeno, un polímero o copolímero de poli(ácido láctico), un polímero o copolímero de polietilenglicol y derivados químicos de los mismos.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "base" se refiere a una disolución de base en que las células madre mesenquimales se suspenden en la composición terapéutica celular. Como la base, se usa preferiblemente disolución salina fisiológica, disolución salina tamponada con fosfato o Hartman-D (Choongwae Pharma Corp.).

40 En una realización preferida, la composición terapéutica celular se prepara en una forma farmacéutica adecuada para inyección. Para este fin, las células madre adiposas de la presente invención se disuelven preferiblemente en una disolución acuosa farmacéuticamente aceptable o se congelan en un estado de disolución. Un estuche que comprende la composición o las composiciones de la presente invención puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable deseado que se puede usar para suspender o diluir las células madre adiposas. Ejemplos de dicho portador incluyen agua destilada, disolución salina fisiológica, PBS y similares.

45 Las composiciones de la presente invención pueden contener un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable o cualquier estabilizante o agente de prevención de la adsorción necesario para proporcionar una preparación farmacéutica que sea adecuada para administración a seres humanos o animales. Las composiciones de la presente invención se pueden formular en la forma de una disolución inyectable (por ej., disoluciones de inyección para inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa e intraperitoneal). En la inyección de la composición inventiva, se puede usar, un agente analgésico, que puede aliviar dolores, y si es necesario, también se puede usar un dispositivo adecuado.

50 Las composiciones terapéuticas celulares de la presente invención se pueden cargar en una jeringa, un dispositivo, un criovial en que se pueden congelar las células o un vial de vidrio exento de pirógenos que comprende tapones de caucho y tapas de aluminio, que contiene fármacos líquidos.

55 Como dispositivo, se puede usar una jeringa o una multi-jeringa y en el caso de isquemias de las extremidades, se usa una aguja de calibre 20-30, que puede minimizar el dolor durante la administración de células sin causar daño a las células debido a la compartición de las células, considerando la profundidad de un sitio o músculo en que se

administran las células. También, se fabrica la jeringa o el dispositivo de un material que no influya en la viabilidad de las células.

5 Las composiciones terapéuticas celulares de la presente invención pueden contener, si es necesario, al menos uno seleccionado de entre: agente de suspensión, agentes solubilizantes, estabilizantes, agentes isotónicos, conservantes, agentes que previenen la adsorción, tensioactivos, diluyentes, vehículos, agentes de ajuste del pH, agentes analgésicos, agentes tampón, agentes reductores que contienen azufre y antioxidantes, dependiendo del modo de administración o formulación de los mismos.

10 Los ejemplos de los agentes de suspensión pueden incluir metilcelulosa, Polisorbato 80, hidroxietilcelulosa, goma de acacia, polvo de goma de tragacanto, carboximetilcelulosa de sodio, monolaurato de polioxietileno sorbitán, etc. Los agentes solubilizantes incluyen aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietileno sorbitán, Macrogol y ésteres etílicos de ácido graso de aceite de ricino. Los estabilizantes incluyen dextrano 40, metilcelulosa, gelatina, sulfito de sodio, metasulfito de sodio, etc. Ejemplos de los agentes isotónicos son D-manitol y sorbitol.

15 Ejemplos de los conservantes incluyen parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol. Ejemplos de los agentes que previenen la adsorción incluyen albúmina de suero humano, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de etileno-óxido de propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno y polietilenglicol.

20 Los agentes reductores que contienen azufre incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tiodiglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales de los mismos, tiosulfato de sodio, glutatión y compuestos que contienen sulfhidrilo tales como ácido tioalcanoico con 1 a 7 átomos de carbono.

25 Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales de los mismos, L-palmitato de ascorbilo, L-estearato de ascorbilo, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo o agentes quelantes tales como etilendiaminotetracetato de disodio (AEDT), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio. Los crioconservantes incluyen, por ejemplo, DMSO, glicerol, etc.

Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender aditivos convencionales, tales como sales inorgánicas, incluyendo cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio e hidrogenocarbonato de sodio y sales orgánicas, incluyendo citrato de sodio, citrato de potasio y acetato de sodio.

30 En particular, en el caso de agentes terapéuticos celulares previos, que se suspendieron y se almacenaron en disolución salina fisiológica en condiciones de almacenaje en frío, fue difícil demostrar una viabilidad celular de más del 70%, cuando se almacenaron durante 48 horas o más; sin embargo, en el caso de las composiciones terapéuticas celulares inventivas que contenían células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, humanas, cuando se añadió sacarosa o albúmina a la composición, se demostró una viabilidad celular de más de 70%, incluso cuando se almacenó durante 48-72 horas, que sugiere que había mejorado la estabilidad. También, en 35 el caso de las composiciones inventivas, se observó que, incluso cuando se usaba Hartman-D o PBS en vez de disolución salina fisiológica como la base, no hubo diferencia significativa en la estabilidad celular y la adición de sacarosa o albúmina mejoró la estabilidad de las composiciones terapéuticas celulares.

40 Por otra parte, cuando se almacenaron las composiciones terapéuticas celulares inventivas que contenían células madre procedentes de tejido adiposo en condiciones de almacenaje congelado, la composición que contenía disolución salina fisiológica, sacarosa, albúmina y DMSO crioconservante mostró la viabilidad celular mayor en la descongelación y se observó que la adición de albúmina y componentes de azúcar a las composiciones terapéuticas celulares protegía las células durante la congelación y descongelación de las células para mejorar la viabilidad de las células.

Ejemplos

45 De ahora en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento de células madre multipotentes de tejido adiposo.

50 Se obtuvo tejido adiposo de liposucción abdominal y se lavó con PBS y después finalmente se cortó. Se digirió el tejido cortado en medio DMEM enriquecido con colagenasa tipo 1 (1 mg/ml), a 37°C durante 2 horas. Se lavó el tejido digerido con PBS y después se centrifugó a 105 rad/s (1.000 rpm) durante 5 minutos. Se separó por succión el sobrenadante y los botones que quedaban en el fondo se lavaron con PBS y después se centrifugaron a 105 rad/s (1.000 rpm) durante 5 minutos. Se filtraron los botones resultantes por una malla de 100 μ m para retirar las partículas, seguido por lavado con PBS. Se incubaron las células resultantes en un medio DMEM (FBS al 10%, NAC 2 mM, ácido ascórbico 0,2 mM). Después de un periodo durante la noche, se lavaron las células no unidas con PBS, y se cultivaron en medio Queratinocito-SFM (que contenía NAC 2 mM, ácido ascórbico 0,2 mM, calcio 0,09 mM, 5 55 ng/ml de rEGF, 50 μ g/ml de BPE, 5 μ g/ml de insulina y 74 ng/ml de hidrocortisona) al tiempo que se reemplazaba el medio a intervalos de dos días, aislando así células madre multipotentes (FIG. 1).

La FIG. 1 muestra fotografías tomadas a aumentos x100 para las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, aisladas como se describió anteriormente.

Ejemplo 2: Características inmunológicas de células madre multipotentes de procedencia adiposa.

5 Las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo obtenidas en el Ejemplo 1 se lavaron con PBS y se trataron con tripsina. Las células tratadas se recogieron y se centrifugaron a 105 rad/s (1.000 rpm) durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó después con una mezcla de FBS al 2% y PBS, seguido por centrifugación a 105 rad/s (1.000 rpm) durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se suspendieron las células en PBS y se dispensaron 1×10^5 células para cada muestra en una placa de pozos. Se puso un anticuerpo (anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón conjugado con R-ficoeritrina) en cada pozo y se incubó sobre hielo
10 durante 40 minutos. Después de la incubación, se centrifugó el medio a 105 rad/s (1.000 rpm) durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con PBS dos veces. Después de lavar, se fijaron las células con paraformaldehído al 1%, analizándose así los antígenos superficiales de células madre multipotentes usando un citómetro de flujo (Tabla 1 y FIG. 2).

Tabla 1: Análisis FACS de antígenos de la superficie de células madre de procedencia adiposa.

Antígenos de la superficie	Los AD-MSC
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

15 Como resultado, como se muestra en la Tabla 1, las células madre adultas procedentes de tejido adiposo según la presente invención mostraron respuestas positivas de 91% para CD73, 97% para CD90, 96% para CD29, 83% para CD44 y 80% para CD105. También, las células madre inventivas mostraron respuestas inmunológicas negativas para todos de: CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 y HLA-DR.

20 Ejemplo 3: Formación de esferas de células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo humanas.

Las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, obtenidas en el Ejemplo 1 se almacenaron en condiciones de disolución salina, disolución salina + sacarosa, disolución salina + sacarosa + albúmina al 5% y PBS + sacarosa y después se examinó su capacidad de formación de esferas.

25 Se sembraron 5×10^4 - 1×10^5 /ml de las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo, humanas, obtenidas en el Ejemplo 1 en cada pozo de una placa de 6 pozos que contenía un medio MEBM sin suero enriquecido con CORM-2 10 μ M, 5 ml de disolución antimicótica de antibiótico (X100), 1 μ g/ml de hidrocortisona, 5 μ g/ml de insulina, 20 ng/ml de EGF, 40 ng/ml de FGF, B27 y β -mercaptoetanol. Como resultado, las células empezaron a formar la conformación de esferas a partir de los 3-7 días después de la siembra y como se muestra en la FIG. 3, las células proliferaron para formar esferas incluso a los 7-10 días después de la siembra.

30 Ejemplo 4: Examen de efecto angiogénico *in vitro* de células madre procedentes de tejido adiposo.

Se examinó si las células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo formaban vasos sanguíneos a través de un ensayo de formación de tubos *in vitro* usando células, que se expusieron o no se expusieron a una tensión de

cizallamiento de 0,5 N/m² (5 dinas/cm²) (tensión de cizallamiento intravascular).

Para este fin, se calentó y se fundió Matrigel (Chemicon, USA) y después se añadió el gel fundido a una placa de 96 pozos y se solidificó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Después, las células madre multipotentes procedentes de tejido adiposo obtenidas en el Ejemplo 1 se dispensaron en la placa de pozos a una concentración de 1 x 10⁴ células/pozo y se incubaron con EGM-2MV (Clonetics, USA) durante 5 días y se examinó si las células incubadas se diferenciaban en células endoteliales vasculares. Como resultado, como se muestra en la FIG. 4, se observó, que las células madres mesenquimales procedentes de tejido adiposo inventivas, cuando se exponían a tensión de cizallamiento, se diferenciaban en células endoteliales vasculares para formar una estructura similar a una red vascular.

5 Ejemplo 5: Examen de efecto angiogénico *in vivo* de células madre procedentes de tejido adiposo.

5-1: Construcción de modelo isquémico de ratón.

Después de que se anestesiaran en general ratones desnudos de 8 semanas, se realizó una escisión en la línea del medio de las patas izquierdas y se aislaron las arterias femorales y sus ramas laterales y se ligaron. Después, se retiraron completamente las arterias femorales izquierdas, creando así un modelo de extremidades inferiores isquémicas.

15

5-2: Efecto angiogénico de células madre procedentes de tejido adiposo en modelo isquémico de ratón.

A las 24 horas después de que se creara el modelo isquémico de ratón construido en el Ejemplo 5-1, se dividieron los modelos de ratón, según la concentración de células, en tres grupos: un grupo LD (1x10⁶ células/kg), un grupo MD (5x10⁶ células/kg) y un grupo HD (1x10⁷ células/kg). Después, se inyectaron las células por vía intramuscular en los sitios isquémicos de los ratones.

20

Se observó de manera continua si tenía lugar la retirada de las extremidades inferiores, se evaluó el grado de mejora del flujo sanguíneo en los ratones por formación de imágenes de perfusión de láser Doppler a las 4 semanas después del tratamiento celular. Como resultado, en el grupo de control negativo inyectado sólo con disolución salina, tuvo lugar retirada de las extremidades inferiores y se pudo observar en las imágenes de perfusión de láser Doppler que cuanto mayor era la concentración de las células inyectadas, más suave era el flujo sanguíneo (FIG. 5). Cuando se analizó el grado de mejoría del flujo sanguíneo con respecto a la razón de perfusión de láser Doppler, el grupo inyectado con las células madre procedentes de tejido adiposo inventivas mostró una mejora dependiente de la dosis en el flujo sanguíneo comparado con el grupo al que se inyectó disolución salina como el grupo de control (FIG. 6).

25

30 Ejemplo 6: Ejemplos de formulación de composición terapéutica de células madre durante almacenaje en frío.

En las formulaciones durante almacenaje en frío a una temperatura de aproximadamente 4°C hasta que se administran por inyección, se examinaron las viabilidades de las células según la proporciones de disolución salina fisiológica, disolución de Hartman-D, PBS y sacarosa como una disolución isotónica útil para mantener la estabilidad de las células. También, para establecer las condiciones en que las células no se agregan o precipitan durante el almacenaje en frío se examinaron los efectos de un aumento y disminución en los contenidos de AEDT y albúmina de suero humano sobre las viabilidades de las células (Tabla 2).

35

Como resultado, en comparación con el caso en que se almacenaron células en disolución salina fisiológica, disolución de Hartman-D o PBS sola, en el caso de formulaciones, que comprenden sacarosa como agente isotónico, albúmina como un agente de prevención de la adsorción o AEDT, se demostró una mayor viabilidad de las células y las células no se agregaron.

40

Tabla 2: Viabilidad de las células en condiciones de almacenaje en frío.

Viabilidad celular (%)	0	3	6	9	12	24	48	72
Disolución salina fisiológica	97,1	96,3	93,2	90,9	89,2	86,9	70,3	57,2
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 1%	97,8	92,4	93,1	88,8	84,2	71,5	67,2	59,0
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%	97,9	92,2	89,4	89,6	79,9	77,4	78,9	64,9
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 10%	98,7	93,9	88,3	89,0	83,0	73,3	75,5	63,8
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%+ albúmina al 2%	97,8	98,0	95,5	90,8	82,4	83,3	71,5	72,1

(continuación)

Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%	98,3	96,9	95,7	86,1	85,5	80,6	78,4	75,0
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%+ albúmina al 5% + AEDT 1 mM	99,0	95,5	94,3	92,1	93,0	81,7	83,3	79,7
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%+ albúmina al 2%+ AEDT 10 mM	97,7	95,3	96,0	93,9	88,8	83,2	84,5	78,6
PBS	99,1	94,5	91,2	89,3	90,7	85,5	69,2	54,8
PBS + sacarosa al 2%	97,6	90,2	89,5	79,4	82,1	83,7	72,0	65,2
PBS + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%	98,4	89,5	92,2	86,1	83,2	81,7	77,9	70,1
Hartman-D	99,4	90,0	91,5	82,2	81,9	70,2	55,3	54,9
Hartman-D + sacarosa al 2%	97,2	92,1	84,0	86,7	83,3	79,2	72,9	71,2
Hartman-D + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%	97,7	93,8	87,3	79,2	80,9	81,3	75,0	71,4

Ejemplo 7: Ejemplos de formulación de composición terapéutica de células madre durante almacenaje congelado.

Se examinó la viabilidad celular en varias formulaciones que comprendían varios aditivos incluyendo crioconservantes, además de disolución salina fisiológica como una base para asegurar la estabilidad congelado-descongelado de la composición terapéutica de células madre inventiva durante el almacenaje congelado de la composición terapéutica de células madre.

La viabilidad celular que resulta de la adición de disolución salina fisiológica, disolución de Hartman-D o PBS como un excipiente, sacarosa o manosa como una disolución isotónica útil para mantener la estabilidad de las células, albúmina de suero humano, que se usa en crioconservación de células y DMSO, se observó después de congelar y descongelar las células.

Como resultado, se observó que la viabilidad celular en condiciones de almacenaje congelado aumentó más en una formulación que comprendía disolución salina fisiológica, PBS o disolución de Hartman-D, como una base, sacarosa al 2% y albúmina al 5% y en una formulación que comprendía, además de estos materiales, DMSO crioconservante (Tabla 3).

Tabla 3: Viabilidad celular en condiciones de almacenaje congelado.

Viabilidad celular (%)	0	24 h	48 h	72 h
Disolución salina fisiológica	97,1	82,3	80,0	81,3
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2%	97,9	78,9	81,3	82,2
Disolución salina fisiológica + DMSO al 10%	96,6	87,5	86,5	80,9
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2% + albúmina al 5%	98,3	80,4	84,2	83,1
Disolución salina fisiológica + sacarosa al 2% + albúmina al 5%+ DMSO al 10%	97,7	89,7	87,9	88,0
Disolución salina fisiológica + manosa al 2%	98,1	83,0	80,1	79,8
Disolución salina fisiológica + manosa al 2% + albúmina al 5%	97,3	87,7	83,4	82,1
Disolución salina fisiológica + manosa al 2% + albúmina al 5%+ DMSO al 10%	98,5	86,4	87,3	87,9

(continuación)

PBS	99,1	82,3	79,0	77,4
PBS + sacarosa al 2%	97,2	87,2	78,0	83,5
PBS + DMSO al 10%	97,6	84,8	86,5	82,3
PBS + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%	98,4	83,2	81,8	81,0
PBS + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%+ DMSO al 10%	98,0	86,2	79,3	85,4
Hartman-D	99,4	73,6	69,9	65,4
Hartman-D + sacarosa al 2%	97,2	70,2	78,9	73,2
Hartman-D + DMSO al 10%	98,0	84,2	83,7	81,1
Hartman-D + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%	97,7	87,1	76,6	79,3
Hartman-D + sacarosa al 2%+ albúmina al 5%+ DMSO al 10%	96,9	88,0	83,2	87,3

Aplicabilidad industrial

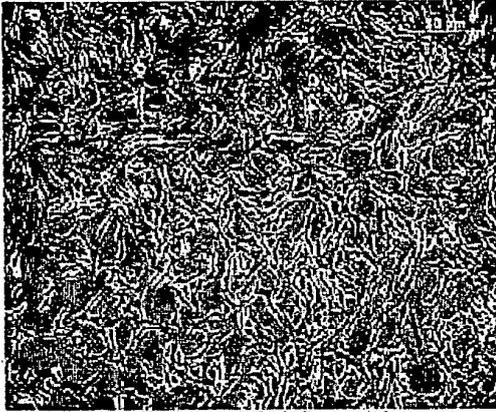
5 Como se describió con detalle anteriormente, la presente invención proporciona composiciones terapéuticas de células y su uso para tratar isquemias, en la que las composiciones contienen células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, humanas, como ingredientes activos. Las composiciones terapéuticas celulares según la presente invención inducen angiogénesis alrededor de vasos sanguíneos cerrados en las lesiones isquémicas para reforzar el flujo sanguíneo y así son útiles para tratar isquemias.

10 Aunque la presente invención se ha descrito con detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que esta descripción es sólo para una realización preferida y no limita el alcance de la presente invención. Así, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas y los equivalentes de las mismas.

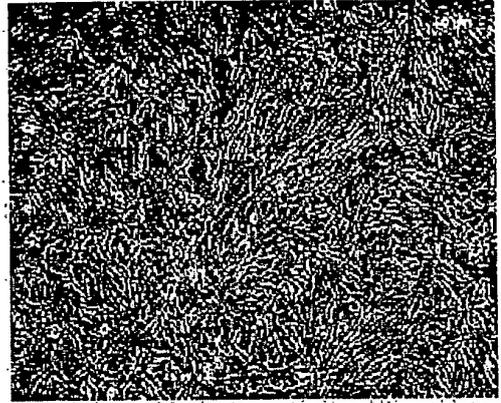
REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica celular, que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina fisiológica, sacarosa al 2%, albúmina al 5% y AEDT 1 mM.
- 5 2. Una composición terapéutica celular, que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina fisiológica, sacarosa al 2%, albúmina al 2% y AEDT 10 mM.
3. Una composición terapéutica celular, que contiene 1×10^5 - 1×10^8 células/ml de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, disolución salina fisiológica, sacarosa al 2%, albúmina al 5% y DMSO al 10%.
- 10 4. La composición terapéutica celular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso para tratar isquemias.

FIG. 1



Día 3



Día 4

FIG. 2

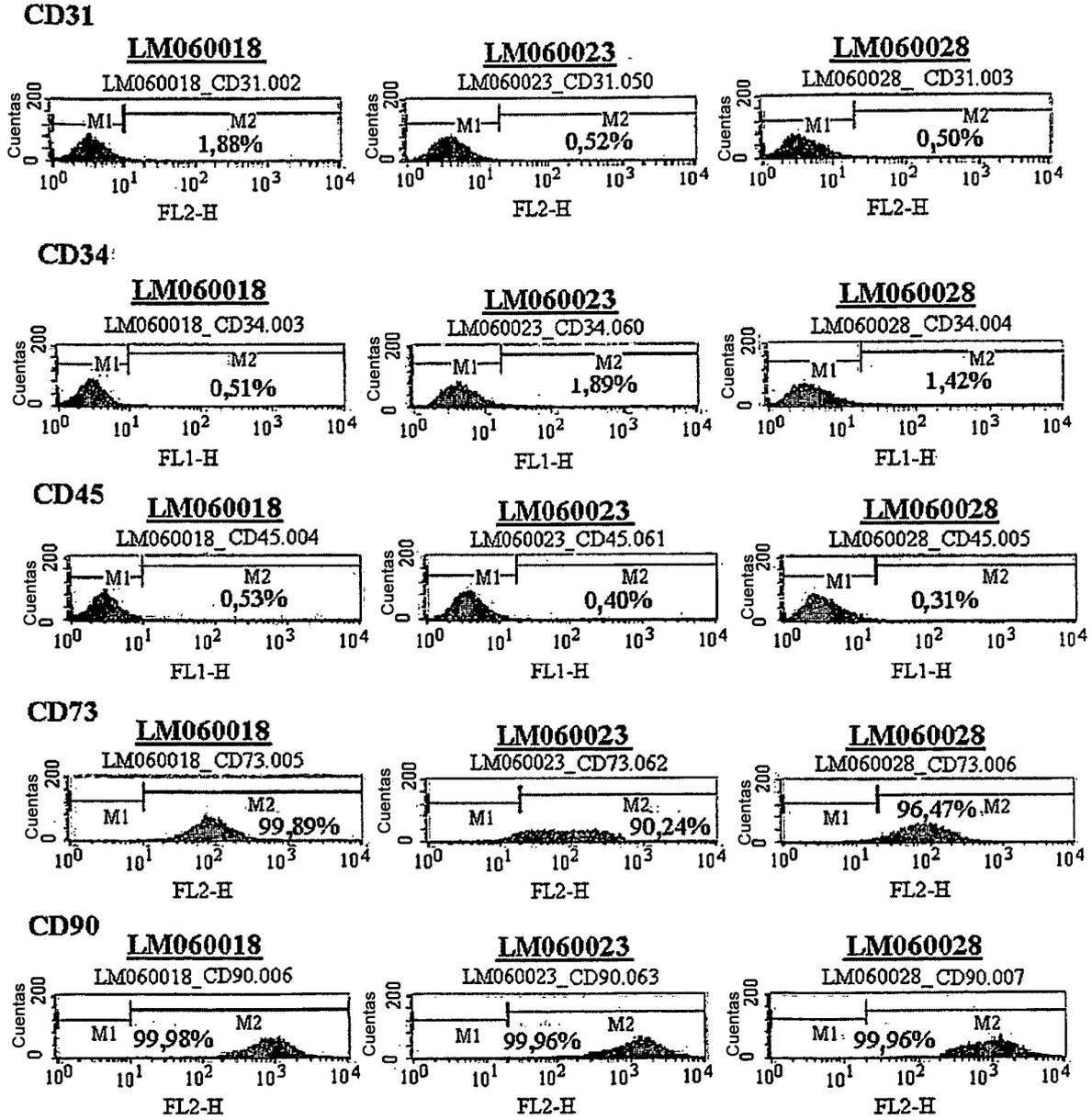
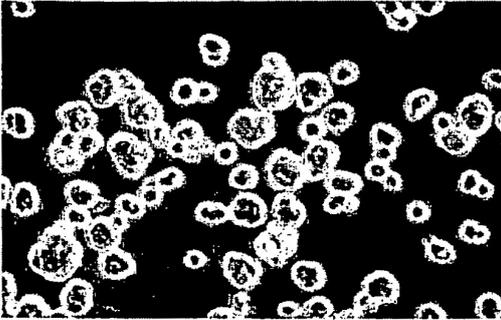
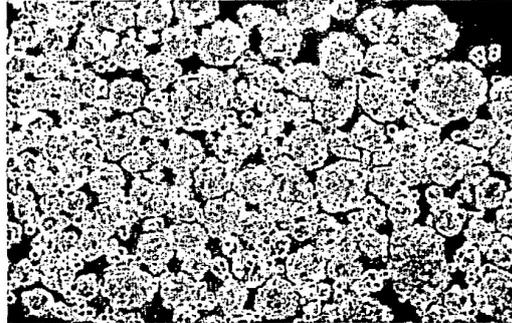


FIG. 3

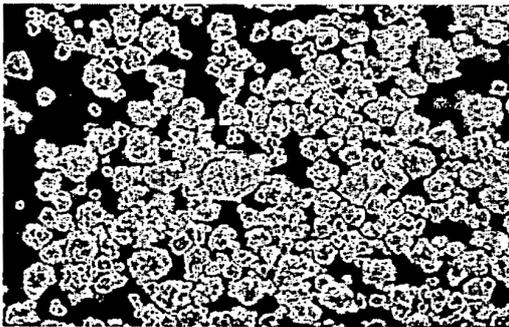
Disolución salina



Disolución salina + sacarosa



Disolución salina + sacarosa + albúmina



PBS+ sacarosa

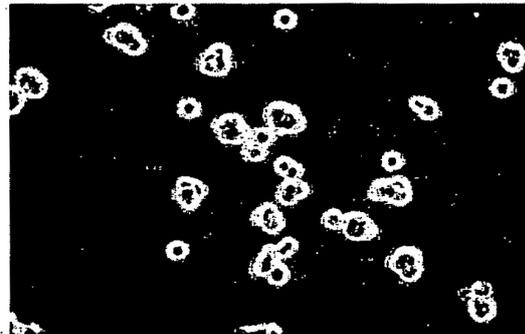


FIG. 4

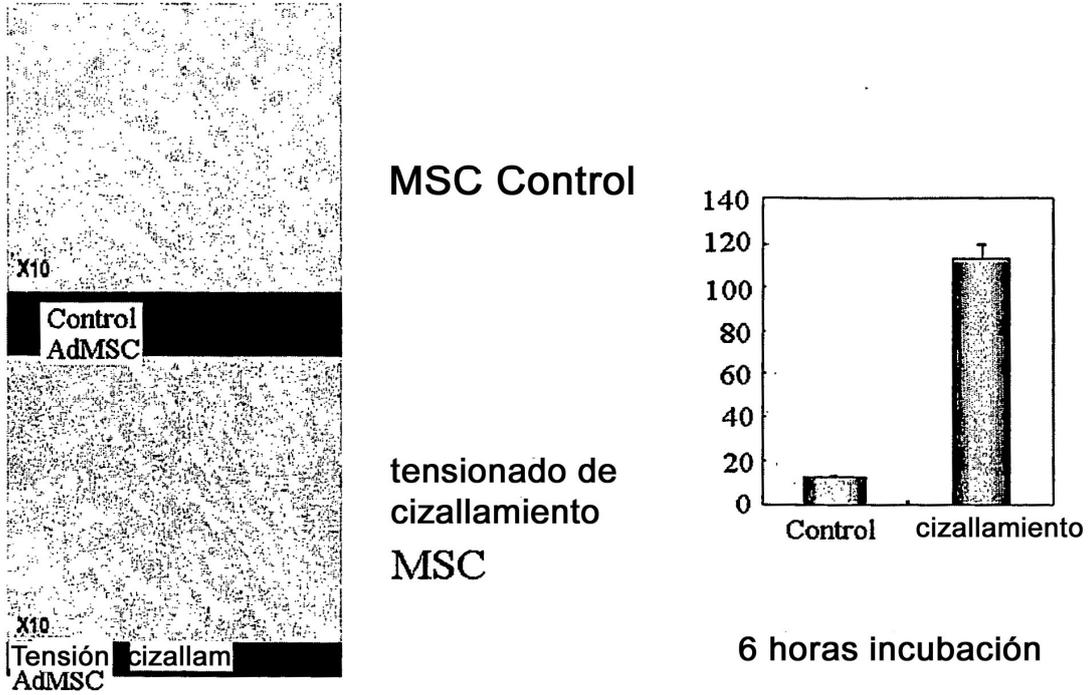


FIG. 5

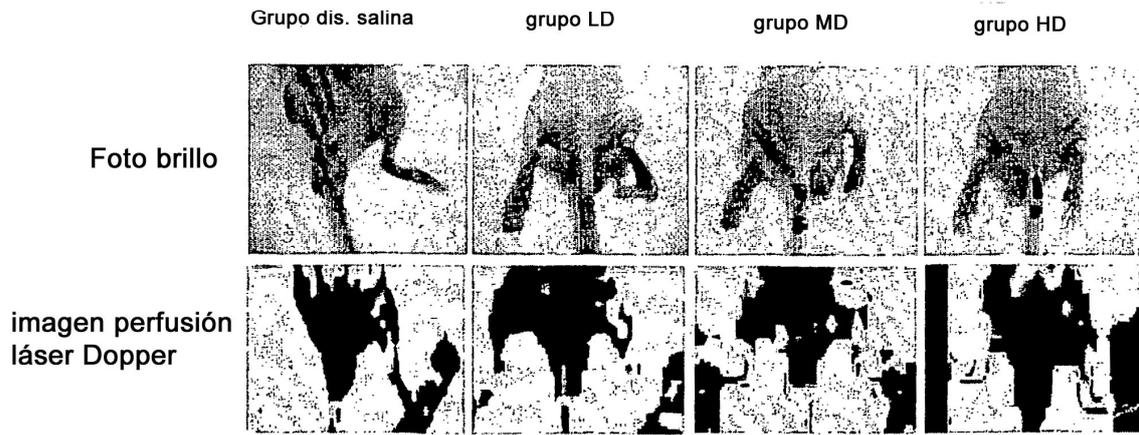


FIG. 6

