

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 560**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2007 E 11150452 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2314300**

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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.02.2014**

73 Titular/es:

**AASTROM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)**

**Domino's Farms, Lobby K, 24 Frank Lloyd Wright Drive**

**Ann Arbor, MI 48105, US**

72 Inventor/es:

**HAMPSON, BRIAN;**

**GOLTRY, KRISTIN;**

**SMITH, DOUGLAS M;**

**ROWLEY, JONATHAN A. y**

**VENTURI, NAIA**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 441 560 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 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones de poblaciones celulares mixtas, a su posterior utilización *in vivo* para la reparación de tejidos y a procedimientos, dispositivos y sistemas para la preparación de 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 pequeñas (por ejemplo del tamaño de una célula) de un líquido o solución que las contiene.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La medicina regenerativa aprovecha, de una manera clínicamente dirigida, la capacidad de las células regenerativas, por ejemplo las células madre y/o las células progenitoras (es decir, las células maestras no especializadas del cuerpo), de renovarse indefinidamente y desarrollarse para formar células especializadas maduras. Las células madre se encuentran en embriones durante los estadios tempranos del desarrollo, en tejido fetal y en algunos órganos y tejidos adultos. Las células madre embrionarias (en lo sucesivo denominadas "CME") es conocido que se convierten en muchos, si no todos, los tipos celulares y tisulares del cuerpo. Las CME 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 tremendo potencial para la medicina regenerativa. Por ejemplo, las CME pueden crecer para convertirse en tejidos específicos tales como el cardiaco, pulmonar o renal, que después podrían utilizarse para reparar órganos dañados o enfermos. Sin embargo, los tejidos derivados de CME presentan limitaciones clínicas. Debido a que las CME no se derivan necesariamente de otro individuo, es decir, un embrión, existe el riesgo de que el sistema inmunológico del receptor rechace el nuevo material biológico. Aunque se dispone de fármacos inmunosupresores para evitar dicho rechazo, también es conocido que estos fármacos bloquean respuestas inmunológicas deseadas, tales como las que se enfrentan a las infecciones por bacterias y virus.

Además, el debate ético acerca del origen de las CME, es decir, los embriones, está bien documentado y supone un obstáculo adicional, y quizás, insuperable, para el futuro próximo.

Las células madre adultas (en lo sucesivo denominadas intercambiablemente "CMA") representan una alternativa a la utilización de las CME. Las CMA residen silenciosamente en muchos tejidos no embrionarios, presumiblemente a la espera de responder a traumatismos u otros procesos patológicos destructivos, de manera que puedan curar el tejido dañado. En especial los últimos datos científicos indican que cada individuo porta un grupo de CMA que podría compartir con las CME la capacidad de convertirse en muchos, si no todos, los tipos celulares y tisulares. De esta manera, las CMA, al igual que las CME, presentan un tremendo potencial para las aplicaciones clínicas de la medicina regenerativa.

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

Aunque las etapas de cultivo celular pueden proporcionar un número, pureza y madurez celulares incrementados, lo hacen a 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 potencial aplicación de las células en los pacientes, coste monetario incrementado, riesgo incrementado de contaminación de las células con microorganismos ambientales durante el cultivo y necesidad de un procesamiento adicional posterior al cultivo para reducir los materiales de cultivo contenidos con las células recolectadas.

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

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

las células del aparato. Además, para poblaciones celulares mixtas, dichos métodos y aparatos pueden provocar un desplazamiento del perfil celular debido a la pérdida preferente de subpoblaciones más grandes y más frágiles.

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 manipulación de tejidos, de composiciones celulares que ya estén listas para la administración directa en el paciente con viabilidad y funcionalidad sustancialmente elevadas y con una reducción sustancial de los materiales necesarios para el cultivo y la recolección de las células. Además, existe la necesidad de procedimientos y dispositivos fiables que permitan la producción de dichas composiciones que resulten adecuados para la implementación clínica y comercialización a gran escala de dichas composiciones como productos de terapia celular.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

En la presente memoria se describen composiciones y métodos para la reparación de tejidos. La composición resulta útil para tratar una diversidad de enfermedades y trastornos, tales como las condiciones isquémicas (por ejemplo la isquemia de extremidades, la insuficiencia cardiaca congestiva, la isquemia cardiaca, la isquemia renal y ERET, ictus, e isquemia ocular), condiciones que requieren la regeneración de órganos o tejidos (por ejemplo la regeneración de hígado, páncreas, pulmón, glándula salival, vaso sanguíneo, hueso, piel, cartílago, tendón, ligamento, cerebro, pelo, riñón, músculo, músculo cardiaco, nervio y extremidades), enfermedades inflamatorias (por ejemplo enfermedad cardiaca, diabetes, lesión de la médula espinal, artritis reumatoide, osteoartritis, inflamación debido al reemplazo o revisión de cadera, enfermedad de Crohn y enfermedad del injerto contra el huésped) y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo diabetes de tipo 1, soriasis, lupus sistémico y esclerosis múltiple).

Asimismo, se describe en la presente memoria una composición de células aisladas para la reparación de tejidos que contiene una población mixta de células. Las células se encuentran en una solución de electrolitos de grado farmacéutico 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 o hígado fetal. Las células son de linaje hematopoyético, mesenquimal y endotelial. La viabilidad de las células es de por lo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior. El número total de células viables en la composición es de entre 35 millones y 300 millones y en un volumen inferior a 25 ml, 20 ml, 15 ml, 10 ml, 7,5 ml, 5 ml o menos. Por lo menos 5% de las células viables en la composición son CD90<sup>+</sup>. Por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% o más son CD90<sup>+</sup>. En algunos aspectos, por lo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 50% o más de las CD90<sup>+</sup> coexpresan CD15. Preferentemente, las células son aproximadamente 5% a 75% CD90<sup>+</sup> viables, siendo las células restantes en la composición CD45<sup>+</sup>. Las células CD45<sup>+</sup> son CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> ó VEGFR1<sup>+</sup>.

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 del receptor de interleuquina-1, interleuquina-6, TGF- $\beta$ , interleuquina-8, interleuquina-10 ó proteína quimioatrayente 1 de monocitos. Entre los factores angiogénicos se incluyen, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular, la angiopoyetina 1, la angiopoyetina 2 ó el 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 en cada periodo de 24 horas por cada 10<sup>5</sup> células, de una o más citoquinas proinflamatorias, tales como interleuquina-1 alfa, interleuquina-1 beta, interferón gamma o interleuquina-12. Las células expresan además indolamina-2,3-dioxigenasa, PD-L1 ó ambas.

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 de feto bovino, reactivo de recolección enzimáticamente activo (por ejemplo tripsina) y se encuentra sustancialmente libre de micoplasmas, endotoxinas y contaminación microbiana. Preferentemente la composición contiene 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,05 ó menos  $\mu$ g/ml de albúmina de suero bovino y 5, 4, 3, 2, 1, 0,1 ó 0,05  $\mu$ g/ml de reactivo de recolección enzimáticamente activo.

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 de alfa-tri-calcio, fosfatos de beta-tri-calcio e hidroxiapatitos), 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 mismos.

En la presente memoria se describen además métodos de modulación de una respuesta inmunológica, una respuesta inflamatoria o la angiogénesis en un paciente mediante la administración de una composición de células mixtas en cultivo en el paciente, en el que la composición de células en cultivo produce por lo menos una citoquina, tal como un antagonista de receptor de la interleuquina-1, la interleuquina-6, la interleuquina-8, la interleuquina-10, el factor de crecimiento endotelial vascular, la proteína quimioatrayente de monocitos 1, la angiopoyetina-1, la angiopoyetina-2 y el factor de crecimiento de los hepatocitos. Opcionalmente, la composición celular produce dos, tres, cuatro, cinco o más citoquinas. Preferentemente, la composición produce menos de 10  $\mu$ g/ml de interleuquina-1 alfa, interferón gamma o interleuquina-12. Por ejemplo, la composición celular contiene 0,1% a 10% de células T

CD4<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, 1% a 50% de monocitos CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> y 5% a 75% de células estromales de médula ósea CD45-CD90<sup>+</sup>. Preferentemente, la composición celular es una de las composiciones celulares indicadas anteriormente.

La invención proporciona un método para el procesamiento de células en cultivo. El método produce una población celular mixta, en el que más de 5% de la población celular es CD90<sup>+</sup>.

El método incluye: proporcionar una biocámara para el cultivo de células, proporcionar un medio de cultivo para el cultivo de células en la biocámara e inocular la biocámara con células. Las células se cultivan y tras un periodo de cultivo de duración predeterminada, se desplaza el medio de cultivo de la biocámara con una primera solución de enjuague biocompatible que sustituye sustancialmente la primera solución de enjuague por una solución enzimática de recolección celular y se incuba el contenido de la biocámara durante un periodo de tiempo predeterminado de manera que durante la incubación el enzima por lo menos disocia las células unas de otras y/o de la superficie de la biocámara. La solución enzimática se sustituye por una segunda solución de enjuague para desplazar la solución enzimática. La cámara se llena sustancialmente con la segunda solución de enjuague. Preferentemente, la segunda solución de enjuague es una solución capaz de inyectarse en un ser humano. Opcionalmente, el método comprende además una o más etapas de adición, incluyendo el desplazamiento de una parte de la segunda solución de enjuague con un gas con el fin de obtener un volumen reducido predeterminado de líquido en la cámara, agitar la cámara para resuspender las células sedimentadas y drenar la solución con las células suspendidas en un recipiente de recolección celular. Tras drenar la solución en un recipiente de recolección celular, se añaden cantidades adicionales de la segunda solución a la biocámara y ésta se agita para enjuagar las células residuales.

También se encuentran incluidas en la invención células en cultivo y una composición que contiene las células en cultivo producida mediante los métodos de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la recolección de células en cultivo. El método incluye las etapas de desplazar el medio de cultivo de una biocámara con una primera solución de enjuague biocompatible, sustituir sustancialmente la primera solución de enjuague por una solución enzimática de recolección celular e incubar el contenido de la biocámara durante un periodo de tiempo predeterminado con la solución enzimática. Durante la incubación, el enzima por lo menos disocia unas células de otras y/o de la superficie de cultivo de la biocámara. La solución enzimática se desplaza con una segunda solución de enjuague. La cámara se llena sustancialmente con la segunda solución de enjuague.

Opcionalmente, el método incluye además una o más de las etapas siguientes:

desplazar una parte de la segunda solución de enjuague con un gas con el fin de obtener un volumen reducido predeterminado de líquido en la cámara, y agitar la cámara para resuspender las células sedimentadas, drenar la solución con células suspendidas hacia el interior de un recipiente de recolección de células. Tras drenar la solución en un recipiente de recolección celular, se añaden cantidades adicionales de la segunda solución a la biocámara y ésta se agita para enjuagar las células residuales.

Las células se derivan de células mononucleares, por ejemplo las células mononucleares son de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o hígado fetal.

En todavía un aspecto adicional la invención proporciona métodos para separar micropartículas de un líquido o solución que las contiene proporcionada en una cámara que presenta un volumen y geometría predeterminados mediante la introducción de un segundo líquido/solución dentro de la cámara para desplazar el primer líquido que las contiene, en la que la geometría de la cámara permite que los líquidos fluyan por la cámara según un flujo de pistón y el segundo líquido desplaza sustancialmente el volumen de la cámara por lo menos una vez. Opcionalmente se introduce un gas a una tasa que establezca un flujo de pistón, a la que el gas desplaza un líquido/solución contenida en la cámara para reducir el volumen de líquido/solución y de esta manera concentra las partículas dentro del líquido/solución en la cámara. El método incluye además agitar la cámara para resuspender las partículas sedimentadas en el líquido/solución contenida en la cámara y drenar la solución al interior de un recipiente de recolección.

El caudal para la introducción de soluciones y/o gases añadidos a la biocámara para cualquiera de los métodos descritos es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 1,0 volumen intercambiados/min. Preferentemente, la tasa de flujo para la introducción de soluciones y/o gases añadidos a la biocámara es de entre aproximadamente 0,50 y aproximadamente 0,75 volúmenes intercambiados/min. Opcionalmente, los líquidos/soluciones o gases se introducen en la biocámara según un flujo de pistón radial.

El segundo líquido o líquido/solución posterior puede ser inyectado en un ser humano.

Se describe además una composición que comprende una mezcla de células en la que por lo menos 1% de las células coexpresa los marcadores de superficie celular CD90 y CD15. En realizaciones preferentes, por lo menos 20%, por lo menos 50%, por lo menos 75% o por lo menos 95% de las células en la mezcla coexpresa los marcadores de superficie celular CD90 y CD15. Las células preferentemente se derivan de médula mononucleares, por ejemplo las células son de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o hígado fetal. Las células pueden encontrarse en una solución de electrolitos de grado farmacéutico adecuada para la administración humana

y puede comprender además una matriz biocompatible. También se proporciona la utilización de la composición del presente aspecto en un método de reparación o regeneración ósea.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y reivindicaciones, posteriormente.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Diversos otros objetivos, características y correspondientes ventajas de la presente invención se apreciarán más completamente a medida que ésta se entienda mejor a partir de la descripción detallada siguiente, considera conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que los caracteres de referencia designan partes similares o correspondientes en toda la serie de dibujos, y en la que:

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

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

La figura 3 es una ilustración esquemática que ilustra otra realización del sistema global de la figura 1.

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

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

La figura 6 es una vista esquemática que muestra el camino del líquido en el casete celular según una realización de la invención.

La figura 7 es una vista esquemática en sección de la parte de biocámara de un casete celular según una realización de la invención.

Las figuras 8A y 8B son vistas superior y en sección de una tapa de biocámara según una realización de la invención.

Las figuras 9A y 9B son vistas superior y en sección de un disco de lecho celular de biocámara según una realización de la invención.

Las figuras 10A y 10B son vistas superior y en sección de una base de biocámara según una realización de la invención.

La figura 11 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de proporción de recolección de lavado/lavado CYTOMATE<sup>®</sup> para el % de viabilidad celular tras el lavado, tras la concentración y tras el almacenamiento; % de CD90, % de CD14auto<sup>+</sup>, % de Vegfr1<sup>+</sup>, frecuencia de UFC-F y UFC-GM y albúmina de suero bovino (ASB) residual.

La figura 12 es un gráfico de columnas que muestra los resultados de proporción de lavado de recolección/lavado CYTOMATE<sup>®</sup> para el número total de células viables tras el lavado, de número total de células viables en el producto final, el número total de células CD90<sup>+</sup> viables, el número total de células CD14<sup>+</sup>auto<sup>+</sup> viables, el número total de células VEGFR1<sup>+</sup> viables, el total de UFC-F y el total de UFC-GM.

La figura 13 es un gráfico de columnas que muestra la proporción de frecuencias de CFU-F, (lavado de recolección) / (lavado CYTOMATE<sup>®</sup>).

La figura 14 es un gráfico de columnas que muestra las UFC-F en cada dosis de las CRT. Se utilizó el recuento de células viables tras el lavado medido mediante Nucleocounter para calcular CFV-F/dosis, excepto en los casos en que no se encontraba disponible y se utilizaron datos de azul tripán (muestras 106-70 y 106-72). Para cada pareja de columnas para cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados con el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> 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 de CFU-GM, (lavado de recolección) / (lavado CYTOMATE<sup>®</sup>).

La figura 16 es un gráfico de columnas que muestra las UFC-GM en cada dosis de CRT. Se utilizó el recuento de células viables tras el lavado medido mediante Nucleocounter para calcular las UFC-GM/dosis, excepto en los casos en que no se encontraba disponible y se utilizaron datos de azul tripán (muestras 106-70 y 106-72). Para cada pareja de columnas de cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados con el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> y la columna derecha muestra los resultados con el lavado de recolección.

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

La figura 18 es un gráfico de columnas que muestra la viabilidad total de las CRT tras la administración mediante agujas medida con un Nucleocounter tras llevar a cabo el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. La columna de la izquierda

representa el control, la columna intermedia representa una aguja de calibre 25 y la columna de la derecha representa una aguja de calibre 30 para cada experimento.

La figura 19 es un gráfico de columnas que muestra las UFC-F tras el almacenamiento de 24 horas y la administración con aguja. Para cada pareja de columnas para cada muestra, la columna izquierda muestra los resultados con 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 normalizada de citoquinas de lavado de recolección/lavado CYTOMATE® para varias citoquinas sobre las CRT.

La figura 21 es un gráfico de columnas que muestra el potencial osteogénico de las CRT del lavado CYTOMATE® y de las CRT del lavado de recolección.

La figura 22A es un gráfico de columnas que muestra la cantidad de calcio producida por cada célula CD90+ sembrada en placa para CRT y células madre mesenquimales (CMM).

La figura 22B es un gráfico de columnas que muestra la cantidad de fosfatasa alcalina producida por cada célula CD90+ sembrada en placa para CRT y células madre mesenquimales (CMM).

La figura 23A muestra un análisis de citometría de flujo de las CRT producidas utilizando el lavado de recolección teñidas para el análisis de dos colores con anticuerpos monoclonales de control (mAb) del mismo isotipo irrelevantes (IgG1, IgG2a).

La figura 23B muestra un análisis de citometría de flujo de las CRT producidas utilizando el lavado de recolección teñidas con anticuerpos monoclonales de control (mAb) anti-CD25 más anti-CD4 conjugados con fluorocromo.

La figura 23C es un gráfico de columnas que muestra el perfil de secreción de citoquinas de las células T en la mezcla de CRT tras la activación específica con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD3 denominado OKT3. Este anticuerpo monoclonal se entrecruza con el complejo de superficie celular de CD3-receptor de célula T (RCT), induciendo de esta manera la liberación de citoquinas por las células T. Se utilizó el análisis Luminex® para evaluar la liberación de IL-2, IFN $\gamma$  e IL-10 en el líquido sobrenadante recogido 48 horas después de la activación de las células T utilizando mAb OKT3.

La figura 24 es un gráfico de columnas que muestra la cantidad relativa de mensajero indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) expresada por CRT inducidas por IFN $\gamma$  determinado mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc). Para cada determinación se muestra la media de tres réplicas de muestra.

La figura 25 es una transferencia western que muestra la expresión de proteína indolamín-2,3-dioxigenasa en CRT inducidas por IFN $\gamma$ .

La figura 26 es un gráfico de columnas que muestra la producción de FCH por las CRT.

La figura 27 es un gráfico de columnas que muestra el porcentaje de células positivas para IDO en CRT inducidas por IFN $\gamma$  según se determina mediante citometría de flujo.

La figura 28 es un gráfico de columnas que muestra el porcentaje de células positivas para PDL1 en CRT inducidas por IFN $\gamma$  según se determina mediante citometría de flujo.

La figura 29A es un gráfico que muestra la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en una respuesta mixta alogénica de leucocitos (RML) en presencia de células T y células dendríticas alogénicas en comparación con las CRT.

La figura 29B es un gráfico que muestra la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en una respuesta mixta alogénica de leucocitos (RML) en presencia de células T más dendríticas alogénicas en comparación con las CRT.

La figura 30 es un gráfico que muestra la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en una respuesta mixta alogénica de leucocitos (RML) en presencia de células T alogénicas conjuntamente con dosis crecientes de CRT sin (no inducidas) o con (inducidas) exposición a IFN $\gamma$ .

La figura 31 muestra radiografías de un paciente accidentado en un andamio y que ha sido tratado con CRT para la fractura de ambas tibias.

La figura 32A muestra una micrografía de un corte histológico de hueso nuevo en un callo de reparación.

La figura 32B muestra una micrografía de campo brillante de un corte histológico de vasos sanguíneos y hueso nuevo que penetra en el aloinjerto.

La figura 32B muestra una micrografía de luz polarizada de un corte histológico de vasos sanguíneos y hueso nuevo que penetra en el aloinjerto.

La figura 33A es una fotografía de una mezcla implantable de CRT/matriz de hueso desmineralizado (MHD) que se ha unido con plasma autólogo.

La figura 33B es una micrografía de una tinción Live/Dead de 24 horas de la mezcla de CRT/MHD a 4X.

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

La figura 34B es una micrografía de una tinción Live/Dead de 14 días de la mezcla de CRT/MHD a 4X.

La figura 35 muestra gráficos en los que las CRT mantienen la secreción de la osteocalcina, IL-6, osteoprotegerina y VEGF durante las dos semanas de cultivo en una mezcla de CRT/MHD.

La figura 36 son fotografías que muestran un dedo del pie de un paciente varón de 69 años de edad tratado con CRT. Antes del tratamiento (izquierda) se observaba una herida que no cicatrizaba. 44 semanas después del tratamiento (derecha) se observaba una cicatrización completa. El paciente sufrió numerosas comorbilidades, incluyendo enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, hipertensión e hiperlipemia.

La figura 37 son fotografías que muestran RM-angiografía de extremidades de un paciente varón de 69 años de edad tratado con CRT. Este paciente recibió inyecciones de CRT en la extremidad derecha. Antes del tratamiento (panel izquierdo) se observaba muy poca colateralización. 48 semanas después del tratamiento (panel derecho) pueden observarse significativamente más ramas colaterales en la extremidad tratada. El

paciente sufrió numerosas comorbilidades, incluyendo enfermedad cardiaca coronaria, hipertensión e hiperlipemia.

La figura 38 es un gráfico de columnas que muestra el incremento o reducción de determinados tipos celulares en las CRT en comparación con las CMN-MO.

La figura 39 es una ilustración que muestra la frecuencia de elementos hematopoyéticos y mesenquimales en las CMN-MO y en las CRT.

La figura 40 es un gráfico de columnas que muestra que los perfiles de producción de citoquinas eran significativamente diferentes en CMN-MO y en CRT procedentes del mismo donante.

La figura 41 A-C es una serie de gráficos de columnas que muestran la frecuencia de CD90 y UFC-F en cultivos de CMN y de CRT. Se generaron CMN y CRT en el sistema biorreactor automático tal como se describe en Materiales y métodos. Se muestra la frecuencia de CD90 y de UFC-F en el cultivo resultante en A. y B., respectivamente. La frecuencia de UFC-F seguidamente se calculó basándose en el número de células CD90 en cada producto. Se muestran los resultados en C. Las columnas negras representan los cultivos de CRT y las columnas blancas representan los cultivos de CMN. Se muestran dos donantes normales independientes.

La figura 42 es un gráfico de líneas que muestra la comparación entre la formación de hueso *in vivo* en un modelo ectópico de ratón. Se determinaron las puntuaciones de hueso para cada densidad celular de carga de cultivos de CMN y de CRT; el gráfico muestra la dosis de carga calculada de células C90<sup>+</sup> de cada cultivo. Los resultados presentados son de un experimento representativo de un donante normal. En este experimento, las CMN eran un 68% CD90<sup>+</sup> y las CRT eran un 22% cCDO<sup>+</sup>.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente memoria se describe el descubrimiento de composiciones y métodos de producción de células para la terapia celular. Las composiciones son una población mixta de células enriquecidas en células madre y progenitoras que son especialmente apropiadas para la administración humana para la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos y la manipulación de tejidos. Estas células se denominan en la presente memoria "células de reparación de tejidos" o "CRT".

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto, la invención proporciona una composición que contiene una población mixta de células de linaje hematopoyético, mesenquimal y endotelial. La composición resulta adecuada para la administración en un ser humano para el uso terapéutico. Las CRT son producidas 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 el desprendimiento y recolección de 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 convenientemente en una etapa de lavado celular posterior al cultivo. Sin embargo, un problema significativo asociado a esta etapa son los daños celulares causados por fuerzas mecánicas aplicadas durante estos procedimientos, manifestadas, por ejemplo, en una reducción de la viabilidad y función biológica de las células y en un incremento del ADN y residuos celulares libres. Esta pérdida de viabilidad y función no sólo presenta un impacto inmediato sobre el producto celular, sino que impacta fuertemente sobre la vida de almacenamiento y el potencial de criopreservación de las células. Además, puede producirse una pérdida significativa de células debido a la incapacidad de transferir la totalidad de las células al aparato de separación, así como de extraer todas las células del aparato.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en otro aspecto la invención proporciona un procedimiento de lavado de las células. Las técnicas de lavado celular de la presente invención, tal como se describen en la sección de Métodos de producción de las CRT, posteriormente, inesperadamente incrementaron en gran medida la viabilidad y rendimiento celulares en comparación con los procedimientos actuales de lavado posterior al cultivo, proporcionando composiciones celulares con niveles residuales de componentes de cultivo que son suficientemente bajos para la administración segura de las células en un paciente.

### Células de reparación de tejidos (CRT)

Las células de reparación de tejidos (CRT) proporcionan una composición celular y molecular de elevada funcionalidad para la reparación de tejidos dañados. Además, se ha demostrado que las CRT presentan efectos antiinflamatorios. Las CRT contienen una mezcla de células de linaje celular hematopoyético, mesenquimal y endotelial producidas a partir de células mononucleares. Las células mononucleares se aíslan a partir de tejidos adultos, juveniles, fetales o embrionarios no humanos. Por ejemplo, las células mononucleares se derivan de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical o hígado fetal. Las CRT 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 y funcionales con la población de células mononucleares que se utilizó como el material de partida. Además, las CRT de la presente invención presentan tanto una viabilidad elevada como niveles residuales bajos de los componentes utilizados durante la producción de las mismas.

La viabilidad de las CRT es de por lo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o superior. La viabilidad se mide mediante métodos conocidos de la técnica, tales como la exclusión de azul tripán. Esta viabilidad

incrementada provoca que la población de CRT resulte más eficaz en la reparación de tejidos, así como potenciadora de la vida de almacenamiento y el potencial de crioconservación del producto celular final.

La expresión "componentes utilizados durante la producción" se refiere, aunque sin limitación, a los componentes medios de cultivo, tales como suero de caballo, suero fetal bovino y soluciones enzimáticas para la recolección celular. Entre las soluciones enzimáticas se incluyen las 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 proporciona una administración segura de CRT en un sujeto que necesita de las mismas.

Preferentemente, las composiciones de CRT de la invención contienen menos de 10, 5, 4, 3, 2, 1 µg/ml de albúmina de suero bovino; menos de 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5 µg/ml de enzimas de recolección (determinado a partir de la actividad enzimática) y se encuentran sustancialmente libres de micoplasmas, endotoxinas y contaminación microbiana (por ejemplo aeróbica, anaeróbica y hongos).

La expresión "sustancialmente libre de endotoxinas" se refiere a que la presencia de endotoxinas en cada dosis de CRT es inferior a la permitida por la FDA para un producto 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 es de 350 EU en cada dosis total de CRT.

La expresión "sustancialmente libre de micoplasmas y contaminación microbiana" se refiere a lecturas negativas para las pruebas generalmente aceptadas que son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, la contaminación por micoplasmas se determina mediante subcultivo de una muestra de producto de CRT en medio calco y distribuida en placas de agar los días 1, 3, 7 y 14 a 37°C con controles positivos y negativos apropiados. Se compara microscópicamente la apariencia de la muestra de producto, a 100x, con la del control positivo y el control 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 de unión a ADN. El producto se considera satisfactorio en el caso de que los procedimientos en medio de agar y/o caldo y el procedimiento con cultivo celular indicador no muestren ninguna evidencia de contaminación por micoplasmas.

La prueba de esterilidad para establecer que el producto se encuentra libre de contaminación microbiana se basa en el método de transferencia directa de la Farmacopea estadounidense. Este procedimiento requiere que un efluente de medio previo a la recolección y una muestra preconcentrada se inoculen en un tubo que contiene medio de caldo triptico de soja y medio líquido de tioglicolato. Estos tubos se observan periódicamente para una apariencia turbia (turbidez) durante una incubación de 14 días. Una apariencia turbia en cualquier día en cualquiera de los medios indicada contaminación, indicando una apariencia clara (sin crecimiento) que se encuentra sustancialmente libre de contaminación.

Se determinó la capacidad de las células de entre las CRT de formar colonias clonogénicas en comparación con las CMN-MO. Se realizó un seguimiento de tanto las colonias hematopoyéticas (UFC-GM) como de las mesenquimales (UFC-F) (Tabla 1). Tal como se muestra en la Tabla 1, mientras que las UFC-F se incrementaron 280 veces, las UFC-GM se redujeron ligeramente en el cultivo.

Tabla 1

	Introducción de CMN-MO (x10 <sup>6</sup> )	Producción de CRT (x10 <sup>6</sup> )	Factor de exp.
UFC-GM	1,7	1,1 ±0,2	0,7 ± 0,1
UFC-F	0,03	6,7±1,3	280 ± 67
Los resultados son medias ± SEM de 8 experimentos a escala clínica.			

Las células de la composición de CRT 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 CMN-MO y CRT iniciales (Ver la Tabla 2). Estas diferencias fenotípicas y funcionales diferencian claramente las composiciones iniciales de CRT de las de células mononucleares.

Tabla 2

Linaje	Marcador	%	Total (en millones)	%	Total (en millones)	Factor de expansión
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 medias de 4 experimentos a escala clínica.

Se examinaron marcadores para los linajes hematopoyético, mesenquimal y endotelial. Los resultados medios de 4 experimentos que comparan las CMN-MO iniciales y el producto de CRT se muestran en la figura 38. La mayoría de células del linaje hematopoyético, incluyendo las mieloides CD11b, los monocitos CD14auto<sup>-</sup>, las progenitoras CD34 y las linfoides CD3, se redujeron ligeramente, mientras que los macrófagos CD14auto<sup>+</sup> se expandieron 81 veces. Las células mesenquimales, definidas por CD90<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>/166<sup>+</sup>/45<sup>-</sup>/14<sup>-</sup> presentaban expansiones de hasta 373 veces. Las células que podrían haber participado en la vascularización, incluyendo las células endoteliales vasculares maduras (CD144/146) y las células de soporte CXCR4/VEGFR1<sup>+</sup> se expandieron entre 6 y 21 veces.

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

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

Tabla 3

	CRT análisis 1	CRT análisis 2
% de CD90 <sup>+</sup>	29,89	18,08
% de CD90 <sup>+</sup> CD15 <sup>-</sup>	10,87	3,18
% de CD90 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	19,02	14,90
% de CD15 <sup>+</sup> de entre las CD90	63,6	82,4

En contraste, la población CD90 de entre las células mononucleares de médula ósea (CMN-MO) típicamente constituía menos de 1%, constituyendo las células CD45<sup>+</sup> resultantes más de 99% de las células nucleadas en las CMN-MO. De esta manera, se produjo una reducción significativa de muchas de las células hematopoyéticas maduras en la composición de CRT en comparación con la población de células mononucleares iniciales (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 CRT en comparación con las células madre mesenquimales y las células madre derivadas de tejido adiposo. (Deans R.J., Moseley A.B., 2000. Exp. Hematol. 28: 875-884, 2000; Devine S.M., 2002. J Cell Biochem Supl. 38: 73-79, 2002; Katz A.J. *et al.*, 2005. Stem Cells. 23:412-423, 2005; Gronthos S. *et al.*, 2001. J Cell Physiol 189:54-63, 2001; Zuk P.A. *et al.*, 2002. Mol. Biol. Cell. 13: 4279-95, 2002).

Por ejemplo, las células madre mesenquimales (CMM) se encuentran altamente purificadas para CD90<sup>+</sup> (más de 95% CD90<sup>+</sup>), con un porcentaje muy bajo de CD45<sup>+</sup> (en caso de encontrarse presentes). Las células madre

derivadas de tejido adiposo son más variables, aunque también típicamente presentan más de 95% de CD90<sup>+</sup>, sin prácticamente células sanguíneas CD45<sup>+</sup> formando parte de la composición. También existen las células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), las cuales se cultivan a partir de CMN-MO y resultan en una población CD90 pura diferente de las CMN que coexpresan CD49c. Otras células madre que se utilizan son tipos celulares altamente purificados, incluyendo células CD34<sup>+</sup>, células AC133<sup>+</sup> y células CD34<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>, que por su propia naturaleza presentan pocas o ninguna célula CD90<sup>+</sup> como parte de la composición y que, de esta manera, son sustancialmente diferentes de las CRT.

El análisis de marcadores celulares también ha demostrado que las CRT aisladas siguiendo los métodos de la invención presentan porcentajes más altos de células CD14<sup>+</sup>auto<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> y VEGFR<sup>+</sup>.

Tabla 4

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

Cada uno de los tipos celulares presentes en una población de CRT presenta propiedades inmunomoduladoras diferentes. Los monocitos/macrófagos (CD45<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>) inhiben la activación de las células T y además muestran expresión de indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO) por los macrófagos (Munn D.H. y Mellor A.L., *Curr Pharm Des.* 9:257-264, 2003; Mum 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.* 156:523-532, 1996). Los monocitos y los 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 de los trasplantes (Fandrich F. *et al.* *Hum. Immunol.* 63:805-812, 2002). Las células T reguladoras (CD45<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) regulan la respuesta inflamatoria innata tras una 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 frente 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 del 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<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup>) expresan IDO 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 la actividad antiinflamatoria (Aggarwal S. y Pittenger M.F., *Blood* 105:1815-1822, 2005).

Las CRT también muestran una expresión incrementada del ligando de muerte programada 1 (LMP1). La expresión incrementada de LMP1 se asocia a la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. La expresión de LMP1 se asocia a un estado no inflamatorio. Las CRT presentan una expresión incrementada de LMP1 en respuesta a la inducción inflamatoria, mostrando otro aspecto de las cualidades antiinflamatorias de las CRT.

Las CRT, en contraste con las CMN-MO, 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 CRT producen: 1) interleuquina-6 (IL-6), 2) interleuquina-10 (IL-10), 3) factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), 4) proteína quimioatrayente de monocitos 1 (PQM-1) y 5) antagonista de receptor de la interleuquina 1 (IL-1ra). Las características de estas cinco citoquinas se resumen en la Tabla 5, a continuación.

5

Tabla 5. Características de las citoquinas expresadas por las CRT	
CITOQUINA	CARACTERÍSTICA
IL- 1ra	Receptor señuelo de IL-1 que regula negativamente la inflamación. IL-1ra e IL-10 son producidas 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 adicionalmente la diferenciación de Th2 mediante la regulación positiva de la expresión de NFAT1 e inhibe la diferenciación proinflamatoria de Th1 mediante la inducción del supresor de la señalización de citoquinas SOCS1.
IL-10	Producida por tipos celulares que median en actividades antiinflamatorias; inmunidad de tipo Th2, inmunosupresión y reparación de tejidos. IL-10 e IL-1ra son producidas característicamente por macrófagos activados alternativamente. IL-10 también participa 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 regula la diferenciación de TH2, indicando una propiedad antiinflamatoria, particularmente en caso de que se equilibre con MIP- $\alpha$ .
VEGF	Citoquina angiogénica con propiedades inmunosupresoras simultáneas que actúan al nivel de la célula presentadora de antígenos.

Entre las características adicionales de las CRT se incluyen la falta de capacidad de producción espontánea, o una producción de nivel muy bajo de determinandos mediadores cruciales que es conocido que activan la ruta inflamatoria de TH1, incluyendo la interleuquina-alfa (IL-1 $\alpha$ ), la interleuquina beta (IL-1 $\beta$ ), el interferón- gamma (IFN $\gamma$ ) y, más notablemente, la interleuquina-12 (IL-12). Resulta importante que las CRT producen estas últimas citoquinas de tipo TH1 espontáneamente durante la sustitución del medio o en cultivos por perfusión o tras la inducción deliberada con estímulos inflamatorios conocidos, tales como lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Las CRT producen niveles bajos de IFN $\gamma$  sólo tras la inducción de las células T por mAb anti-CD3. Finalmente, las CRT producidas mediante los presentes métodos producen más de las citoquinas antiinflamatorias IL-6 e IL-10, así como menos de la citoquina inflamatoria IL-12.

Además, las CRT son inducibles para la expresión de un enzima regulador inmunológico clave denominado indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO). Las CRT según la presente invención expresan niveles más altos de IDO tras la inducción con interferón- $\gamma$ . Se ha demostrado que la IDO regula negativamente las respuestas inflamatorias tanto nacientes como actuales en modelos animales y en el ser humano (Meiserl R. *et al.*, Blood 103:4619-4621, 2004; 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 3, 2003).

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

Tal como se ha comentado anteriormente, las CRT se encuentran altamente enriquecidas en una población celular que coexpresa CD90 y CD15.

CD90 se encuentra presente en células madre y progenitoras que pueden diferenciarse en múltiples linajes. Estas células son una población heterogénea de células que probablemente se encuentran en diferentes estados de diferenciación. Se han identificado marcadores celulares en las células madre de origen embrionario o fetal que define el estado de célula madre de la célula. Uno de estos marcadores es SSEA-1, también denominado CD15. Se encuentra CD15 sobre las 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 las células madre mesenquimales purificadas derivadas tanto de médula ósea humana como de tejido adiposo (ver la Tabla 6). De esta manera, la población celular en las CRT que coexpresan tanto CD90 como CD15 son una población celular única y pueden definir el estado de tipo célula madre de las células CD90 derivadas de adulto.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en otro aspecto de la invención, la población celular que expresan tanto CD90 como CD15 puede 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<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup>. Las CRT pueden enriquecerse adicionalmente en células CD90<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> mediante métodos

45

conocidos de la técnica, tales como la selección positiva o negativa utilizando anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie celular. Las CRT que han sido enriquecidas adicionalmente en células CD90<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup> resultan particularmente útiles en la reparación y regeneración óseas.

5

Tabla 6

Fenotipo celular	CRT	CMN P0
% de CD90 <sup>+</sup>	23,99	98,64
% de CD15 <sup>+</sup>	39,89	0,76
% de CD15 <sup>+</sup> /CD90 <sup>+</sup>	19,54	0,22
N	2	4

Se evaluaron UFC-F y el potencial osteogénico de las CD90<sup>+</sup> CD15<sup>+</sup>. Al eliminar las células CD90<sup>+</sup>, se eliminó todas las UFC-F y el potencial osteogénico *in vitro*. Inesperadamente, aunque la frecuencia global de CD90 y UFC-F era más alta en cultivos de CMN (en las que las CD90 no expresan CD15), el número relativo de UFC-F por cada células CD90 era drásticamente más alto en las CRT (figura 41). Lo anterior demuestra que las células CD90 son mucho más potentes con las CRT que al cultivarse en forma de poblaciones celulares purificadas.

10

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

15

### Métodos terapéuticos

Las células de reparación de tejidos (CRT) resultan útiles para una diversidad de métodos terapéuticos, entre ellos la reparación de tejidos, la regeneración de tejidos y la manipulación de tejidos. Por ejemplo, las CRT resultan útiles en la regeneración ósea, la regeneración cardíaca, la regeneración vascular, la regeneración neural y el tratamiento de los trastornos isquémicos. Entre las condiciones isquémicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la isquemia de las extremidades, la insuficiencia cardíaca congestiva, la isquemia cardíaca, la isquemia renal y ERET, el ictus y la isquemia ocular. Además, debido a las citoquinas inmunorreguladoras producidas por las CRT, 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 (EII), la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), la soriasis, el rechazo de células alogénicas, tejidos u órganos (inducción de tolerancia), las enfermedades cardíacas, las lesión de la médula espinal, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la inflamación debida al reemplazo o revisión de cadera, la enfermedad de Crohn, las enfermedades autoinmunitarias tales como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR) y la esclerosis múltiple (EM). En otro aspecto de la invención, las CRT también resultan útiles para inducir la angiogénesis.

20

25

30

Las CRT se administran en sujetos mamíferos, por ejemplo el ser humano, para llevar a cabo la reparación o regeneración de tejidos. Las CRT se administran alogénica o autogénicamente.

35

Las cualidades únicas de las CRT polarizan fuertemente la respuesta del huésped alejándola de la ruta destructora de tejidos de la inflamación y hacia la reparación de heridas con rápida cicatrización de los tejidos dañados. Además, algunas de las células son capaces de diferenciación específica de tejidos (por ejemplo CD90<sup>+</sup> al hueso), ayudando adicionalmente a la regeneración de los tejidos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las CRT resultan eficaces en la inducción de la reparación de tejidos en un amplio abanico de enfermedades.

40

### Administración farmacéutica y formas de dosificación

Las CRT descritas pueden administrarse en forma de una preparación farmacéutica o fisiológicamente aceptable o de una composición que contiene un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable, y administrarse en los tejidos del organismo receptor de interés, incluyendo seres humanos y animales no humanos. La composición que contiene CRT puede prepararse mediante resuspensión de las células en un líquido o solución adecuado, 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 determinarse rutinariamente por el experto en la materia.

45

50

Las CRT o composiciones de las mismas pueden administrarse mediante aplicación de las suspensiones de CRT sobre material absorbente o adherente, es decir, una matriz de esponja de colágeno, y la inserción del material que contiene CRT en el sitio de interés o sobre el mismo. Alternativamente, las CRT pueden administrarse por vías parenterales de inyección, incluyendo la subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal. Entre otros modos

55

de administración se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la intranasal, intratecal, intracutánea, percutánea, entérica y sublingual. En una realización de la presente invención, la administración de las CRT pueden estar mediada por cirugía endoscópica.

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

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

20 El número de células en una suspensión de CRT y el modo de administración pueden variar según el sitio y condición que se está tratando. A modo de ejemplos no limitativos, según la presente invención se inyectan aproximadamente  $35\text{-}300 \times 10^6$  CRT para llevar a cabo la reparación de tejidos. Consistentemente con los Ejemplos dados a conocer en la presente memoria, un experto en la materia puede modular las cantidades y métodos de los tratamientos basados en CRT según las necesidades, limitaciones y/o optimizaciones determinadas para cada caso.

25 La composición farmacéutica de CRT puede comprender entre aproximadamente 8% y 54% de células CD90<sup>+</sup> y entre aproximadamente 46% y 92% de células CD45<sup>+</sup>. La composición farmacéutica de CRT preferentemente contiene entre aproximadamente  $35 \times 10^6$  y  $300 \times 10^6$  células nucleadas viables y entre aproximadamente  $7 \times 10^6$  y  $75 \times 10^6$  células CD90<sup>+</sup> viables. La composición farmacéutica de CRT preferentemente presenta menos de 0,5 EU/ml de endotoxina y ningún crecimiento bacteriano o fúngico. En realizaciones preferentes, una forma de dosificación de CRT se encuentra comprendida en 4,7 a 7,3 ml de portador acuoso farmacéuticamente aceptable. La solución o suspensión preferente es la Multiple Electrolyte Injection tipo 1 (USP/EP). Cada 100 ml de Multiple Electrolyte Injection tipo 1 contiene 234 mg de cloruro sódico, USP (NaCl), 128 mg de acetato potásico, USP (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>KO<sub>2</sub>) y 32 mg de acetato de magnesio tetrahidrato (Mg(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O). No contiene agentes antimicrobianos. El pH se ajusta con ácido clorhídrico. El pH es de 5,5 (4,0 a 8,0). La Multiple Electrolyte Injection tipo 1 preferentemente se suplementa con 0,5% de albúmina de suero humano (USP/EP). Preferentemente, la composición farmacéutica de CRT se almacena a 0-12°C, no congelada.

#### Indicaciones y modos de administración de CRT

40 Las CRT pueden prepararse y procesarse para la administración en pacientes utilizando los procedimientos descritos, en los que la formulación son las CRT con eliminación sustancial de todos los componentes de cultivo hasta niveles considerados seguros por la FDA. Resulta crucial que las células presenten una viabilidad final superior a 70%; sin embargo, a mayor viabilidad de la suspensión celular final, más potente y eficaz será la dosis celular final, y a menor cantidad de residuos celulares (membranas celulares, orgánulos y ácidos nucleicos libres procedentes de células muertas), los procedimientos que incrementan la viabilidad celular, manteniendo simultáneamente los niveles sustancialmente bajos de componentes de cultivo y recolectados y sistemas de procesamiento asépticos cerrados, resultan altamente deseables.

#### 50 Isquemia de las extremidades

Se ha demostrado que las células derivadas de médula ósea se utilizan para la regeneración vascular en pacientes con isquemia crítica de las extremidades, enfermedad vascular periférica o síndrome de Burger. Las CRT administradas en los pacientes con extremidades isquémicas han demostrado incrementar la regeneración vascular. Las CRT se administran en los pacientes mediante la creación de una suspensión celular y eliminando las CRT de la bolsa o vial suministrado en el que se administran. Se utiliza una jeringa para eliminar la suspensión de CRT y después se cargan volúmenes de inyección individuales más pequeños, de 0,25 ml a 1 ml, desde la jeringa principal utilizando un adaptador de jeringa, y después se administran varios volúmenes de inyección individuales mediante inyección intramuscular en el sitio de la isquemia de extremidades y en donde se requiere formación vascular. Las CRT pueden administrarse mediante un amplio abanico de tamaños de aguja, desde agujas grandes de calibre 16 a agujas muy pequeñas de calibre 30, así como mediante catéteres muy largos de calibre 28 para procedimientos mínimamente invasivos. Alternativamente, las CRT también pueden administrarse intravascularmente y permitirse que alcancen el sitio de isquemia para inducir la regeneración local del tejido.

Regeneración cardiaca

Existe una diversidad de modos de administración para inducir la regeneración del tejido cardiaco. Las CRT se administran intravascularmente y se permite que se dirijan al sitio de regeneración. Alternativamente, las CRT también se administran directamente en el músculo cardiaco, epicardialmente o endocardialmente, así como transvascularmente. Las CRT pueden administrarse durante un procedimiento a tórax abierto o procedimientos mínimamente invasivos, tal como la administración mediante un catéter. Las CRT se administran en estos pacientes mediante la creación de una suspensión celular y eliminando las CRT de la bolsa o vial suministrado en el que se administran. Se utiliza una jeringa para eliminar la suspensión de CRT y después se cargan volúmenes de inyección individuales más pequeños, de 0,25 ml a 1 ml, desde la jeringa principal utilizando un adaptador de jeringa, y después se administran varios volúmenes de inyección individuales mediante inyección intramuscular en el sitio de la isquemia de extremidades y en donde se requiere formación vascular. Las CRT pueden administrarse mediante un amplio abanico de tamaños de aguja, desde agujas grandes de calibre 16 a agujas muy pequeñas de calibre 30, así como mediante catéteres muy largos de calibre 28 para procedimientos mínimamente invasivos.

Regeneración de médula espinal

Existe una diversidad de maneras en las que se utilizan las CRT para la regeneración tras la lesión de médula espinal (LME). Las CRT pueden inyectarse directamente en el sitio de la LME, sembrarse en una matriz (seleccionada de la lista proporcionada posteriormente para la regeneración ósea) y sembrarse en médula espinal resacada o simplemente aplicada en el sitio de manera que las CRT puedan migrar hasta el sitio de la lesión. Alternativamente, las CRT también pueden administrarse intravascularmente y permitirse que alcancen el sitio de isquemia para inducir la regeneración local del tejido.

Existe una diversidad de otras aplicaciones en las que pueden administrarse CRT localmente en el tejido mediante inyección directa, sembrándolas en una matriz para la administración localizada, o administrarse mediante el sistema vascular, permitiendo que las CRT se dirijan al sitio de 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 terminal, el ictus y la isquemia ocular.

Indicaciones ortopédicas para las regeneraciones óseas

Las CRT han sido utilizadas con éxito en aplicaciones de regeneración ósea en el ser humano. Opcionalmente, las CRT 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 ayudar a la manipulación y a las propiedades de administración.

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

Cualquiera de las matrices utilizadas con las CRT puede procesarse en diferentes formas físicas que son comunes de la técnica de las aplicaciones de regeneración de tejidos. Estas formas físicas son espumas y esponjas de poro abierto y cerrado, mallas tejidas o no tejidas basadas en fibras o partículas pequeñas comprendidas entre nanopartículas y partículas de tamaño micrométrico (1 micrómetro ---- 1.000 micrómetros) y macropartículas en la escala de tamaño milimétrica. Las partículas pequeñas también presentan con frecuencia porosidad abierta, en la que los nanoporos ayudan al transporte de nutrientes y metabolitos y proporcionando los microporos unos poros suficientemente grandes para facilitar la siembra de las células y la integración en los tejidos.

En el caso de que las matrices utilizadas para la administración celular sean partículas pequeñas administradas en sitios de lesión, en ocasiones se utilizan materiales o geles viscosos para ligar las partículas que ayudan a la manipulación y administración de los materiales, así como a mantener las partículas y células localizadas en su sitio tras la aplicación. 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 estos materiales, en forma de líquidos viscosos o de hidrogeles blandos o duros. Otros materiales e hidrogeles viscosos son conocidos de la técnica.

En diversas realizaciones, las CRT se administran con FTC, hueso desmineralizado y partículas de hueso mineralizado en tamaños comprendidos entre 200 micrómetros y 5 milímetros, según la aplicación concreta. Opcionalmente, dichos materiales se ligan con coágulos basados en 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 CRT 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 área de no unión ósea es abierta por el cirujano y se retira el hueso necrótico. El hueso o área no unido en donde se necesita hueso puede ser decorticada o no por el cirujano para permitir el sangrado en el sitio, momento en el que el cirujano aplica la mezcla de CRT-matriz entre los huesos en donde se producirá la regeneración. Esta mezcla de CRT y matriz induce la regeneración del tejido, guiando la matriz física la localización de la regeneración ósea y proporcionando las CRT el estímulo de reparación del tejido para inducir la angiogénesis, la cicatrización de la lesión y la regeneración ósea. La mezcla remanente de CRT/matriz se aplica opcionalmente en torno a la línea de fractura tras la colocación de cualquier elemento ortopédico, tal como placas, barras, tornillos o clavos.

### Métodos de producción de CRT

Las CRT se aíslan a partir de cualquier tejido de mamífero que contenga células mononucleares de médula ósea (CMN-MO). Son fuentes adecuadas de CMN-MO, sangre periférica, médula ósea, sangre de cordón umbilical o hígado fetal. Con frecuencia se utiliza sangre debido a que este tejido se obtiene fácilmente. Entre los mamíferos se incluyen, por ejemplo, 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 regenera las CRT se inicia con el enriquecimiento de las CMN-MO a partir del material inicial (por ejemplo tejido) mediante la eliminación de los glóbulos rojos y algunas de las células polinucleadas utilizando un método convencional de fraccionamiento celular. Por ejemplo, las células se fraccionan mediante la utilización de la separación en gradiente de densidad de FICOLL<sup>®</sup>. El volumen de material inicial necesario para el cultivo típicamente es pequeño, por ejemplo 40 a 50 ml, con el fin de proporcionar una cantidad suficiente de células para iniciar el cultivo. Sin embargo, puede utilizarse cualquier volumen de material inicial.

A continuación, se evalúa la concentración de células nucleadas utilizando un contador celular automático y la fracción enriquecida del material inicial se inocula en una biocámara (recipiente de cultivo celular). El número de células inoculadas en la biocámara depende de su volumen. Los cultivos de CRT que pueden utilizarse según 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 biocámara Replicell de Aastrom, se inoculan  $2-3 \times 10^8$  células en total en un volumen de aproximadamente 280 ml.

Antes de la inoculación, se ceba una biocámara con medio de cultivo. A título ilustrativo, el medio utilizado según la invención comprende tres componentes básicos. El primer componente es un componente medio que comprende IMDM, MEM, DMEM, RPMI 1640, medio alfa o medio de McCoy o un componente medio de cultivo equivalente conocido. El segundo es un componente sérico que comprende por lo menos suero de caballo o suero humano y opcionalmente puede comprender además suero de feto bovino, suero de bovino neonato y/o suero bovino. Opcionalmente, pueden utilizarse medios de cultivo libres de 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 biocámara Aastrom Replicell, el medio de cultivo consiste de IMDM, aproximadamente 10% de suero de feto bovino, aproximadamente 10% de suero de caballo, aproximadamente  $5 \mu\text{M}$  de hidrocortisona y 4 mM de L-glutamina. A continuación, se pasaron las células y los medios por la biocámara en un programa controlado de perfusión gradual durante el procedimiento de cultivo. Las células se cultivaron durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ó más días. Preferentemente las células se cultivaron durante 12 días. Por ejemplo, utilizadas con el casete celular del sistema Replicell de Aastrom, los cultivos se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  y 20% de  $\text{O}_2$ .

Estos cultivos se llevaron a cabo típicamente a un pH que era aproximadamente el fisiológico, es decir, 6,9 a 7,6. El medio se mantuvo a una concentración de oxígeno que correspondía a una atmósfera con oxígeno que contiene entre 1% y 20% en vol. de oxígeno, preferentemente entre 3% y 12% en vol. de oxígeno. El intervalo preferente de concentraciones de  $\text{O}_2$  se refiere a la concentración de  $\text{O}_2$  próxima a las células, no necesariamente al punto de introducción de  $\text{O}_2$ , que puede encontrarse en la superficie del medio o a través de una membrana.

Los programas de cultivo estándares requieren el intercambio semanal de medio y suero, como intercambio único realizado semanalmente o un intercambio de la mitad de medio y suero realizado dos veces semanalmente. Preferentemente, el medio nutritivo del cultivo se sustituye, preferentemente se perfunde, continuamente o periódicamente a una tasa de aproximadamente 1 ml por cada ml de cultivo cada periodo de entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas, para células cultivadas a una densidad de entre  $2 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  células por ml. Para densidades celulares de entre  $1 \times 10^4$  y  $2 \times 10^6$  células por ml, puede utilizarse la misma tasa de intercambio del medio. De esta manera, para densidades celulares de aproximadamente  $10^7$  células por ml, la presenta tasa de sustitución del medio puede expresarse como 1 ml de medio por cada  $10^7$  células por cada periodo de entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas. Para densidades celulares superiores a  $10^7$  células por ml, la tasa de intercambio de medio puede incrementarse proporcionalmente para alcanzar un flujo de medio y suero constante por célula y unidad de tiempo.

Se describe un método de cultivo 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 en la presente memoria como referencia). Los aspirados de médula ósea (MO) se diluyeron en solución salina tamponada isotónica (diluyente 2, Stephens Scientific, Riverdale, NJ) y las células nucleadas se contaron utilizando un contador celular Coulter ZM (Coulter Electronics, Hialeah). Los eritrocitos (no nucleados) se lisaron utilizando un lisador manual (Stephens Scientific) y las células mononucleares (MNC) se separaron 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 CMN-MO se lavaron dos veces con medio de cultivo de MO a largo plazo (CMOLP), que es un medio de Dulbecco modificado por Iscove (MDMI) suplementado con L-glutamina 4 mM (GIBCO BRL, Grand Island, NY), suero de feto bovino (FBS) al 10% (Bio-Whittaker, Walkersville, MD), suero de caballo al 10% (GIBCO BRL), 20 µg/ml de vancomicina (Vancocin® HCl, Lilly, Indianapolis, IN), 5 µg/ml de gentamicina (Fujisawa USA, Inc., Deerfield, IL) e hidrocortisona 5 µM (Solu-Cortef®, Upjohn, Kalamazoo, MI) antes del cultivo.

15 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) suplementado con albúmina sérica. Alternativamente, las células se lavaron en la biocámara antes de la recolección utilizando el procedimiento de recolección de lavado descrito posteriormente. Opcionalmente después de la recolección las células se concentraron y se crioconservaron en un recipiente biocompatible, tal como recipientes de criogenización 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 µg/ml de ADNasa humana recombinante (Pulmozyme®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA) para inhibir la aglutinación celular durante la descongelación. El recipiente de criogenización se transfirió a un casete preenfriado y se crioconservó bajo una tasa de congelación 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 la fase líquida. Los volúmenes preferentes para los cultivos concentrados se encontraban comprendidos entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 15 ml. Más preferentemente, las células se concentraron hasta un volumen de 7,5 ml.

Post-cultivo

Tras recolectarlas de la biocámara, las células se mantuvieron en una solución que consistía de diversos componentes disueltos que eran necesarios para dar soporte al cultivo de las células, así como componentes disueltos producidos por las células durante el cultivo. Muchos de estos componentes no eran seguros o de otro modo no resultaban adecuados para la administración en el paciente. Por lo tanto, para crear células listas para el uso terapéutico en el ser humano resulta necesario separar los componentes disueltos de las células mediante sustitución de la solución de cultivo por una nueva solución que presente una composición deseada, al como una solución de electrolitos inyectable de grado farmacéutico adecuada para el almacenamiento y la administración humana de las células en una aplicación de terapia celular.

Un problema significativo asociado a muchos procedimientos de separación es el daño celular causado por las fuerzas mecánicas aplicadas durante estos procedimientos, manifestadas, 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 significativa de células debido a la incapacidad de transferir la totalidad de las células al aparato de separación, así como de extraer todas las células del aparato.

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

**Tabla 7. Rendimiento de 2 dispositivos de separación celular diferentes, 3 estudios diferentes.**

	<b>Procesador celular COBE 2991 (n=3)</b>	<b>Lavador celular CYTOMATE® (n=8)</b>	<b>Lavador celular CYTOMATE® (n=26)</b>
<b>Operación principal</b>	Centrifugación	Filtración	Filtración
<b>Estudio de referencia</b>	Informe interno de protocolo de Aastrom n° PA-VB10043	Informe de desarrollo de nuevo procedimiento de lavado de Aastrom MF n° 0384 informe MF n° 0384	US Fracture Clinical BB-IND n° 10486 TRIAL- n°
<b>Pre-separación media</b>	93%	93%	95%
<b>Post-separación media viabilidad celular</b>	83%	71%	81%
<b>Reducción media de la frecuencia de CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup></b>	18%	69%	No disponible
<b>Recuperación celular media</b>	73%	74%	No disponible

Estas limitaciones de la técnica crean dificultades para implementar los procedimientos de fabricación y producción para crear poblaciones celulares adecuadas para el uso humano. Resulta deseable que el procedimiento de separación minimice los daños a las células y de esta manera resulte en una solución celular con menos componentes disueltos no deseados, conservando simultáneamente elevadas viabilidad y función biológica con mínima pérdida de células. Además, resulta importante minimizar el riesgo de introducir contaminantes microbianos que resulten en un producto final inseguro. Una menor manipulación y transferencia de las células reducirá inherentemente dicho riesgo.

La invención descrita en la presente exposición supera la totalidad de dichas limitaciones de la técnica actual mediante la implementación de un procedimiento de separación para lavar las células que minimiza la exposición de las mismas a fuerzas mecánicas y que minimiza el atrapado de células que no pueden recuperarse. En consecuencia, el daño a las células (por ejemplo una viabilidad o función reducidas), la pérdida de células y el desplazamiento del perfil celular resultan minimizados, separando eficazmente los componentes de cultivo disueltos no deseados. En una implementación preferente, 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 transferencia y separación utilizando otros aparatos. El procedimiento de lavado según la invención se describe posteriormente.

Recolección de lavado

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

Para separar los materiales de cultivo de las células, puede introducirse un nuevo líquido de la composición deseada (o gas), preferentemente en el centro de la biocámara y preferentemente a un caudal controlado predeterminado. Lo anterior resulta en que el líquido resulta desplazado y expulsado a lo largo del perímetro de la biocámara, por ejemplo por las aberturas 48, el cual puede ser recogido en la bolsa de desecho 76.

En algunas realizaciones de la invención, el diámetro del espacio líquido en la biocámara es de aproximadamente 33 cm, la altura del espacio líquido es de aproximadamente 0,33 cm y los caudales de adición de líquidos de enjuague y/o de recolección a la biocámara es de entre aproximadamente 0,03 y 1,0 intercambios de volumen (IV) por minuto y preferentemente de entre 0,5 y aproximadamente 0,75 IV por minuto. Lo anterior corresponde sustancialmente a aproximadamente 8,4 a aproximadamente 280 ml/min y preferentemente a 140 a aproximadamente 210 ml/min. Los caudales y velocidades, según algunas realizaciones, ayudan a garantizar que la mayoría de las células en cultivo resultan retenidas en la biocámara y no se pierden en la bolsa de desecho y que no resulta necesario un periodo de tiempo excesivamente prolongado para completar el procedimiento. Generalmente, la cantidad de células en la cámara puede encontrarse comprendida entre  $10^4$  y  $10^8$  células/ml. Para las CRT, la cantidad puede encontrarse comprendida entre  $10^5$  y  $10^6$  células/ml, correspondiente a 30 a 300 millones de células en total para las dimensiones de biocámara indicadas anteriormente. Evidentemente el experto en la materia entenderá que variará el número de células al variar las dimensiones de la biocámara.

Según algunas realizaciones, al recolectar las células en cultivo de la biocámara, puede seguirse el procedimiento siguiente, que se describe en líneas generales en la Tabla 3, posteriormente. Las soluciones introducidas en la biocámara se añaden al centro de la misma. La bolsa de medio de desecho 76 puede recoger el líquido correspondiente desplazado tras cada etapa, en la que se introduce un líquido o gas en la biocámara. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, tras cultivar las células se rellena la biocámara 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 biocámara a un caudal de entre aproximadamente 140 y 210 ml por minuto hasta expulsar de la biocámara entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,0 litros del volumen total (etapa 1).

Aunque un único intercambio de volumen para la introducción de un líquido nuevo o diferente en la biocámara reduce significativamente el líquido anterior dentro de la biocámara, quedará cierta cantidad del líquido anterior. De acuerdo con ello, intercambios de volumen adicionales del líquido nuevo/diferente reducirán significativamente la cantidad del líquido anterior.

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

Puede introducirse Isolyte (B Braun) suplementado con HSA al 0,5% a razón de aproximadamente 140 a 210 ml por minuto hasta administrar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 litros del volumen total, para desplazar la solución enzimática (etapa 4).

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

Para reducir el volumen recogido, parte de la solución de Isolyte preferentemente se desplaza utilizando un gas (por ejemplo aire), que se introduce en la biocámara a un caudal dado a conocer (etapa 5). Éste puede utilizarse para desplazar aproximadamente 200 a 250 cm<sup>3</sup> del presente volumen de la biocámara.

A continuación, la biocámara puede agitarse para resuspender las células sedimentadas en la solución (etapa 6). Esta suspensión celular seguidamente puede drenarse a la bolsa de recolección celular 70 (u otro recipiente) (etapa 7). Puede añadirse una cantidad adicional de la segunda solución a la biocámara y puede producirse una segunda agitación con el fin de enjuagar hacia el exterior cualesquiera otras células residuales (etapas 8 y 9). Este enjuague final puede añadirse seguidamente a la bolsa de recolección 70 (etapa 10).

**Tabla 8. Protocolo de recolección de lavado**

Número y nombre de etapa		Descripción
1	<b>Enjuagar hacia el exterior el medio de cultivo</b>	<i>Utilizar cloruro sódico para desplazar el medio de cultivo al interior del recipiente de desecho</i>
2	<b>Añadir solución de tripsina</b>	<i>Sustituir el cloruro sódico en la cámara de cultivo por la solución de tripsina</i>
3	<b>Incubación con tripsina</b>	<i>Incubación estática durante 15 minutos en solución de tripsina.</i>
4	<b>Enjuagar hacia el exterior la solución de tripsina/Transferencia en portador farmacéuticamente aceptable</b>	<i>Añadir Isolyte con HSA al 0,5% para desplazar la solución de tripsina al recipiente de desecho</i>
5	<b>Concentración/Reducción de volumen</b>	<i>Desplazar parte de la solución de Isolyte con aire para reducir el volumen final (etapa de concentración)</i>
6	<b>Agitar la biocámara</b>	<i>Movimiento de balanceo para desprender y suspender las células en la solución de Isolyte para la recolección</i>
7	<b>Drenar al interior del recipiente de recolección</b>	<i>Drenar las células en solución de Isolyte hacia la bolsa de recolección de células</i>
8	<b>Añadir solución de enjuague a la biocámara</b>	<i>Añadir más Isolyte para enjuagar hacia el exterior las células residuales.</i>

(continuación)

Tabla 8. Protocolo de recolección de lavado	
Número y nombre de etapa	Descripción
9	<b>Agitar la biocámara</b>
10	<b>Drenar al interior del recipiente de recolección</b>

En comparación con las CRT producidas utilizando un método convencional para el lavado posterior al cultivo (por ejemplo CYTOMATE®), las CRT producidas utilizando el procedimiento de lavado de recolección muestran una viabilidad posterior al lavado más alta y más consistente, una viabilidad posterior al almacenamiento más alta, un número de células viables totales más alto, un número de células CD90<sup>+</sup> viables totales más alto, ligeramente menos BSA residual y una cantidad de UFC-F y UFC-GM por producto más alta y más consistente. La viabilidad posterior al lavado es más consistente con el nuevo procedimiento de lavado, con una desviación estándar de 2% en comparación con el 10% del procedimiento de lavado CYTOMATE®. Las CRT producidas utilizando el lavado de recolección también presentaban un porcentaje más alto de células CD90<sup>+</sup>, lo que implica la presencia adicionalmente de un porcentaje más alto de células estromales medulares entre las CRT, por lo que el porcentaje de células monocitos/macrófagos entre las CRT es más alto. La presencia de VEGFR1 también se encontraba incrementada en las CRT de lavado de recolección. Aunque el número total final de células viables es más alto con el nuevo procedimiento de lavado, el nuevo producto de lavado contiene más agregados no disociados de células viables que deben distinguirse de los agregados debido a residuos, una fuente probable de los grandes agregados celulares observados ocasionalmente en el producto de lavado CYTOMATE® tras 24 horas de almacenamiento. Estos agregados no disociados aparentemente no interfieren con el almacenamiento o administración del producto celular.

#### Métodos de separación

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

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 la cámara vacía llene la altura antes de fluir horizontalmente. El diámetro de la cámara es suficientemente grande para alojar la cantidad de partículas que debe separarse y típicamente es muchas veces mayor que la altura de la cámara.

Típicamente, la cámara incluye una altura de aproximadamente 0,4 cm para corresponde con la altura deseada para la utilización de la cámara para 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 preferible de la cámara, según algunas realizaciones, puede ser de aproximadamente 280 cm<sup>3</sup>, aunque este volumen (evidentemente) corresponde a los intervalos de diámetro y altura de la cámara.

Antes de iniciar el procedimiento de separación el volumen de la cámara se llena por completo con una primera solución que contiene partículas. Las partículas son de densidad más alta que la solución y 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 una distribución uniforme de las partículas en la superficie del fondo, es una fracción pequeña 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 misma en el perímetro y es dirigida a un punto común de recolección. Como resultado de la geometría, la velocidad lineal del flujo se reduce proporcionalmente a la distancia respecto al centro, de manera que la velocidad lineal es más lenta en donde sale del perímetro de la cámara. El caudal preferentemente se controla de manera que la velocidad lineal sea suficientemente baja para evitar el movimiento de partículas sedimentadas hacia el exterior de la cámara, y para eliminar únicamente líquido en la misma. La altura relativamente pequeña de la biocámara tal como se describe en la presente memoria permite preferentemente un flujo de pistón en la dirección radial para minimizar la mezcla de la solución desplazada con la nueva solución. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, lo anterior permite desplazar de la biocámara un porcentaje elevado de la primera solución con una segunda solución. Puede llevarse a cabo uno o más intercambios de volumen adicionales con la segunda solución para reducir adicionalmente los niveles residuales de la primera solución dentro de la cámara.

Como modo alternativo de funcionamiento, antes de retirar las partículas de la cámara, la primera solución también puede ser desplazada por un gas, tal como el aire, el cual se introduce en el centro de la cámara y en 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 reteniendo las partículas. A continuación, puede introducirse una solución de enjuague de un volumen menor que la cámara a modo de portador para eliminar y recoger las partículas de la cámara en un volumen de solución reducido.

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

Puede utilizarse cualquier solución enzimática utilizada convencionalmente en el cultivo celular para el desprendimiento y recolección de células adheridas. Según el método de la invención, el medio de cultivo con células adheridas contenidas se sustituye por un tampón que contiene el enzima. Las células se exponen al enzima durante un periodo de tiempo de manera que las células adherentes ya no son adherentes. A continuación, el tampón de enzima se sustituye por otro líquido en el que las células pueden almacenarse o ser utilizadas. A continuación, la cámara se agita para provocar la resuspensión 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 enzimáticas para la recolección celular se incluyen tripsinas (de origen animal, de origen microbiano o recombinantes), diversas colagenasas, enzimas de origen microbiano alternativos, agentes de disociación, proteasas generales o mezclas de los mismos. A continuación se proporciona una lista de algunas soluciones enzimáticas de recolección comerciales:

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

#### Sistema de biorreactor

Entre algunas realizaciones de la invención se incluyen métodos y/o dispositivos para crear composiciones celulares posteriormente al cultivo que resultan adecuadas para el uso terapéutico y pueden relacionarse con métodos y dispositivos/sistemas dados a conocer en las patentes US n° 6.326.198 y 6.048.721.

Por ejemplo, el sistema de biorreactor dado a conocer en la patente US n° 6.048.721 puede utilizarse para poner en práctica los métodos según algunas realizaciones de la invención. Una parte de la presente exposición, que describe un sistema para poner en práctica realizaciones de la presente invención se describe posteriormente.

Tal como se muestra en la figura 1, un sistema de 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 auxiliar, un controlador del 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 llenado, el procesamiento y la inoculación de las células, así como la recolección final de las células tras completarse el proceso de expansión.

La simulación de la médula ósea con el fin del crecimiento y expansión ex vivo de células madre y progenitoras hematopoyéticas de mamífero generalmente requiere, entre otras cosas, 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 y cerrado que proporcione oxigenación y perfusión del medio en la biocámara contenida.

En referencia a la figura 5, el elemento primario del casete celular es una cámara de cultivo de biorreactor de tipo discoidal 10 ("biocámara") que presenta una periferia externa preferentemente circular. La biocámara puede estar formada de cuatro componentes principales: una tapa 20, una base 30, un disco de lecho celular 40 y una membrana permeable a los gases e impermeable a los líquidos 50.

Tal como se muestra esquemáticamente en la figura 7, la tapa 20 de la biocámara se fija en la base 30 (preferentemente de una manera hermética a los líquidos), por ejemplo mediante la aplicación localizada de energía para soldar entre sí las dos piezas (u otros medios de cierre, tales como una pluralidad de tornillos), radialmente en su periferia exterior. La membrana 50 se pinza entre la tapa y la base y se estira firmemente de manera que separe el volumen interior de la biocámara en partes superior e inferior.

El disco de lecho celular 40 se encuentra situado dentro de la parte inferior del interior de la biocámara. Generalmente presenta una forma de disco con un labio anular 42 que se extiende hacia arriba en su periferia radial externa. Tras la inoculación de las células iniciales, 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 al ajustar el disco 40 en la base, de manera que la membrana 50 puede cooperar con el labio 42 en el sellado del lecho de crecimiento celular 25.

El disco 40 del lecho celular presenta un puerto de suministro de medio de crecimiento radialmente central 44 que se extiende hacia abajo a través de la base 30 hasta el exterior de la biocámara. Alternativamente, el puerto de suministro de medio de crecimiento puede encontrarse situado en un punto radialmente central en la parte superior del disco 40 del lecho celular y extenderse hacia arriba a través del puerto central elevado 28 hacia el exterior de la biocámara (no mostrado). También presenta por lo menos un puerto de recolección 46 (también puede incluir una pluralidad de puertos de recolección) próximo al límite radialmente exterior del lecho celular, es decir, inmediatamente en el interior del labio 42. El puerto 46 también se extiende a través de la base hasta el exterior de la biocámara. Alternativamente, el puerto o puertos de recolección pueden estar situados próximos 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 biocámara (no mostrados). Finalmente, una pluralidad, por ejemplo 24, de aberturas de descarga de medio de desecho 48 se encuentran situadas en el perímetro del disco 40, permitiendo la comunicación de fluidos entre el compartimiento de lecho celular establecido en la parte superior del disco y el compartimiento de desecho establecido en la parte inferior del disco. Las aberturas 48 preferentemente se encuentran uniformemente espaciadas en torno a la periferia radialmente exterior del disco 40, inmediatamente contiguas al labio 42.

Se suministra un medio de crecimiento rico en nutrientes por el puerto 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 sérico, tal como suero de feto bovino, suero de caballo o suero humano. También puede no contener suero. También pueden añadirse en caso necesario factores de crecimiento y reactivos tales como glutamina. El medio de crecimiento puede suministrarse en bolsas premezclas o puede modificarse in situ.

Desde el puerto de suministro de medio, el medio de crecimiento entra en el lecho celular 24 y fluye radialmente hacia el exterior, hacia la periferia radial del disco 40. A medida que fluye de esta manera, suministra nutrientes y retira productos de desecho, cultivando las células dentro del mismo. Se descarga en forma de medio de desecho del lecho celular mediante el flujo por la pluralidad de aberturas 48, tal como muestran las flechas en la figura 7.

Debido al flujo radialmente hacia al exterior del líquido perfusor y la disposición de las aberturas de salida 48, las células en el lecho de cultivo celular son uniformemente perfundidas con nutrientes. Por ejemplo, el flujo radial del líquido perfusor a una pluralidad de aberturas de salida espaciadas equiangularmente estimula un flujo uniforme de líquido desde la entrada y sobre el lecho celular hasta los sitios de salida perimetrales en la circunferencia del lecho celular.

La base 30 presenta aberturas 32 y 34 por las que los puertos 44 y 46 pueden extenderse de una manera hermética a los fluidos, por ejemplo mediante sellos (no mostrados) entre las aberturas y los puertos. Alternativamente, las aberturas no resultan necesarias en el caso de que el puerto 44 se extienda hacia arriba a través del puerto central 28 y el puerto 46 se extienda directamente desde la base (no mostrado). La base incluye además un puerto de salida 36 situado generalmente en el centro para el líquido de desecho desplazado de la biocámara. El líquido de desecho de las aberturas 48 fluye radialmente hacia el interior, por el espacio entre la superficie del fondo del disco 40 y la superficie superior de la base 30, hasta el puerto 36 y de esta manera es expulsado de la biocámara. El puerto 36 puede ser coaxial, aunque también puede ser ligeramente excéntrico respecto al centro radial de la base 30 con el fin de alojar la abertura 32 para el puerto de entrada de medio 44. Alternativamente, la abertura no resulta necesaria en el caso de que el puerto 44 se extienda hacia arriba a través del puerto central 28 (no mostrado).

La tapa 20 de la biocámara se fija a la base 30 de una manera hermética a los fluidos, con la membrana 50 entre ellas, tal como se ha indicado anteriormente. Puede incluirse un camino laberíntico concéntrico de costillas que se extiende hacia dentro desde la tapa 20 para proporcionar soporte a la membrana 50 frente a la distorsión debida a la

presión fluida del líquido perfusor 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 preciso 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 dentro del lecho de crecimiento celular. Alternativamente, puede utilizarse una serie de soportes periódicos que se extienden hacia abajo desde la tapa 20 y un disco poroso delgado sobre el que se lamina la membrana 40, con el fin de mantener la posición de la membrana para proporcionar un grosor preciso del lecho de crecimiento celular (no mostrado).

Las costillas 22 también forman una cámara de gas de tipo laberíntico por la que puede fluir un líquido de oxigenación, tal como aire, suministrando oxígeno que se difunde por la membrana y hacia el interior del lecho celular. Los dos extremos del laberinto pueden ser contiguos de manera que pueda suministrarse aire de oxigenación al puerto de entrada de gases 24 y descargarse por el puerto de salida de gases 26. Alternativamente, en el caso de que se hayan utilizado soporte periódico en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, el puerto de entrada y el puerto de salida de gases pueden situarse próximos al perímetro de la tapa enfrentados en 180° de manera que pueda suministrarse el aire de oxigenación al puerto de entrada de gases y expulsarse por el puerto de salida de gases (no mostrados).

Se forma un puerto central elevado en forma de campana 28 en el centro radial de la tapa 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 por un septo 28A del puerto central. Para ello, puede fijarse un septo no de látex para agujas en un elemento del puerto con una banda hermética al aire para el acceso directo al área de residencia de las células. Alternativamente, puede extenderse una línea de tubo desde el puerto central que puede conectarse con un recipiente exterior de células utilizando un soldador de tubos estéril (no mostrado).

En referencia a las ilustraciones detalladas de la tapa, base y disco de lecho celular de la biocámara mostrados en las figuras 8 a 10; la tapa 20 de la biocámara se muestra en las figuras 8A y 8B. La tapa 20 preferentemente se forma de un plástico no reactivo transparente moldeado por inyección, tal como poliestireno o PETG. Generalmente presenta una parte principal 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, por lo que pueden pasar tornillos (no mostrados) para fijar la tapa 20 a la base 30. Alternativamente, puede utilizarse una soldadura EMA (electromagnética) para fijar la tapa a la base (no mostrada).

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

Las costillas 22 generalmente presentan una orientación anular y forman un laberinto 20F, tal como muestran las líneas discontinuas en la figura 8A. El laberinto puede ser intrincado, de manera que el gas de oxigenación pueda fluir por una cámara de gases definida de esta manera en la totalidad del lecho de crecimiento celular. Los extremos opuestos del laberinto preferentemente son contiguos entre sí en el extremo radialmente exterior de la parte principal 20A. Un puerto de entrada 24 y el puerto de salida 26 se comunican con extremos opuestos del laberinto. Alternativamente, en el caso de que se utilicen soportes periódicos en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, el puerto de entrada y el puerto de salida de gases pueden situarse próximos al perímetro de la tapa opuestos entre sí en 180° de manera que el aire de oxigenación pueda suministrarse al puerto de entrada de gases y ser expulsado por el puerto de salida de gases (no mostrados).

La costilla radialmente más interior 29 puede ser un anillo continuo que, en cooperación con la membrana 50, sella la cámara de gases definida por el laberinto desde el interior del puerto central 28. La costilla continua radialmente más exterior 20F define el límite más exterior del laberinto. Las puntas de todas las costillas 20F, 22 y 29 son coplanares con la superficie del fondo de la pestaña 20B, de manera que las costillas sellan con la membrana 50 cuando la biocámara se encuentra ensamblada. Alternativamente, en el caso de que se utilicen soportes periódicos en lugar del camino laberíntico concéntrico de costillas, las puntas de todos los soportes son coplanares con la superficie del fondo de la pestaña 20B, de manera que se controla la posición de la membrana 50 (no mostrada).

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

En 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 discoidal 30A unida mediante una pestaña periférica elevada 30A que presenta una superficie superior 30B y orificios para

tornillo 30C. Alternativamente, los orificios para tornillo se sustituyen por elementos para llevar a cabo una soldadura EMA para fijar la base a la tapa (no mostrada). En estado ensamblado, el disco 40 se ajusta por completo dentro de los límites de la pestaña periférica 30A con la superficie A estrechamente contigua y coplanar con la superficie 30B. Un labio periférico 30D se extiende hacia arriba desde el borde radialmente exterior de la pestaña 30B para posicionar y retener la membrana 50 durante el ensamblaje de la biocámara.

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

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

Durante el ensamblaje de la biocámara, se sitúan sellos apropiados en las aberturas 32 y 34, y el disco 40 se posiciona dentro de la base 30 con las boquillas de los puertos 44 y 46 extendiéndose herméticamente desde 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 el puerto 44 se extienda hacia arriba a través del puerto central 28 el puerto 46 se extienda directamente desde la base (no mostrada). A continuación, la membrana 50 se coloca sobre el disco 40 y la pestaña 30A, y se mantiene dentro del labio 30D. Alternativamente, la membrana 50 se lamina en un disco poroso, proporcionando estabilidad mecánica adicional previamente a la colocación sobre el disco 40 (no mostrado). La tapa 20 seguidamente se coloca sobre la base con los orificios para tornillo 20C y 30C alineados, y se pasan tornillos por los orificios para tornillo y se apretan para unificar la biocámara. Alternativamente, se utiliza una soldadura EMA para unir la tapa con la base (no mostrada). En este momento, la costilla anular externa 20F tensará la membrana 50 contra la parte radialmente más interna de la superficie 30B, sellando el interior de la biocámara.

En referencia a las figuras esquemáticas 5 y 6, la biocámara 10 se mantiene dentro de una carcasa de un casete celular 100 y forma una unidad desechable preensamblada. La biocámara se fija a una base de casete 60 de la carcasa 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 tapa en la base de la biocámara 10 también pueden extenderse a través de dichos orificios para la fijación de la biocámara en la base de casete 60. Alternativamente, pueden montarse clips de montaje en la base para la fijación de la biocámara en la base en 3 ó más posiciones perimetrales uniformemente espaciadas (no mostradas). La base del casete se encuentra cerrada desde la parte superior por una tapa 64 y desde la parte inferior por una bandeja 66, y se monta un recipiente de suministro de medio 68 a una superficie frontal de la base 60 del casete para suministrar un medio de crecimiento a la biocámara. El recipiente de suministro de medio 68 está provisto de una línea de suministro de medio 68A conectada al puerto de entrada de medio 44 de la biocámara. 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 mediante la línea 68B, y de esta manera se presuriza el medio de crecimiento de manera que proporcione un caudal constante de medio al lecho de crecimiento celular 25 en la biocámara. Se suministró medio de crecimiento adicional al recipiente por el conducto de suministro 68C del recipiente de medio.

Puede conectarse una bolsa de recolección de células 70 (u otro dispositivo de recolección de células recolectadas) al puerto de recolección 46 de la biocámara por el conducto 72 y la válvula de recolección 74.

Una bolsa de líquido de desecho 76 se encuentra situada en la parte inferior de la biocámara y descansa sobre la bandeja 66 del casete celular. Recibe líquido de desecho de la biocámara mediante un dispositivo de cámara de goteo 78 unida a una placa de válvula 80 en la parte posterior del casete celular. La cámara de goteo incluye un interruptor de vacío para permitir una presión baja controlada con precisión dentro de la biocámara. Un contador de goteo (no mostrado) puede asociarse con el dispositivo de cámara de goteo. Cuenta las gotas de líquido de desecho para detectar el caudal.

El líquido de desecho alcanza el dispositivo de cámara de goteo por una válvula de desecho 82. La presión de gas en el puerto central 28 de la biocámara se utiliza para regular el flujo por la cámara de goteo, por la válvula 84 del puerto central y la línea 84A.

También conectado a la placa de válvula puede encontrarse un puerto de suministro 86 de la bomba de aire para suministrar aire comprimido a una presión constante al recipiente de suministro de medio por la línea de suministro 68B de la bomba de aire; los puertos de entrada y salida de gas 88 y 90 para suministrar gas de oxigenación fresco y que descargan el gas de oxigenación ya utilizado a partir de la biocámara; una válvula de suministrado de medio 92 conectada a la línea de administración 68A del recipiente de medio; válvula de HBSS 94, y válvula de tripsina 96.

Alternativamente, la válvula 94 y la válvula 96 se sustituyen por una única válvula para la adición de un abanico de reactivos, tales como HBSS y tripsina (no mostrada).

Cada casete puede incluir además una "clave" que contiene un dispositivo de memoria no volátil y un reloj. Antes de la utilización, la clave del casete se inicializa con datos de trazabilidad, comandos de protocolo y tiempo real a través del controlador del sistema 300. La clave es utilizada por la electrónica del sistema durante el procedimiento de producción celular para registrar los datos pertinentes, así como para acceder a los comandos del protocolo.

Durante la utilización, se suministra un casete celular desechable estéril de un único uso 100 en un paquete protector. Incluye el reservorio de suministro de medio 68, un control de flujo de medio (no mostrado), la biocámara 10, el reservorio de desecho 76, el reservorio de recolección 70, una clave y los tubos, válvulas y empaquetamiento necesarios para interconectar y proporcionar soporte a los componentes. Alternativamente, el reservorio de recolección puede proporcionarse como componente separado y después conectarse con el casete en el momento de la recolección utilizando un soldador de tubos estéril.

Durante el funcionamiento, en primer lugar la clave es inicializada por el controlador del sistema. Tras inicializar la clave, ésta es transferida al procesador 400. El procesador incluye un giroscopio multieje ("wobulador") 410. El wobulador incluye una mesa de soporte 412 sobre la que puede fijarse el casete. El wobulador presenta conexiones mecánicas 414 para hacer girar la mesa de soporte 412 en torno a dos ejes horizontales ortogonales.

Al cargar un casete celular en el procesador 400 y fijarlo en la mesa de soporte 410, y la clave indica que resulta 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, la mesa del wobulador 412 se lleva a una posición inicial horizontal. A continuación, se ceba el casete celular 100 con medio de crecimiento hasta el volumen requerido, utilizando la alimentación por gravedad de medio procedente del reservorio 68. Alternativamente, puede aplicarse presión en el reservorio para facilitar la transferencia de medio. Durante este periodo, la válvula de recolección 74 se encuentra cerrada y la válvula de desecho 82 se encuentra abierta de manera que en el medio en la biocámara 25 puede fluir por las aberturas 48 pero no por la puerta de recolección 46. A continuación, se inclina el casete celular para generar una burbuja que se utilizará para distribuir las células. Seguidamente la biocámara se inocula con células. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante una jeringa hipodérmica que pase por el septo del puerto central y la membrana. Alternativamente, puede conectarse un recipiente con células a una línea de tubo que se extiende desde el puerto central utilizando un soldador para tubos estéril y después inocularse células utilizando gravedad o presión (no mostrado). A continuación, el wobulador hace oscilar el casete celular (es decir, agita el contenido del mismo) según un programa predeterminado con el fin de distribuir las células sobre la superficie superior del disco 40. En este momento la burbuja ayuda a distribuir uniformemente las células dentro de la biocámara. El aire remanente seguidamente se purga por el puerto central y se saca el casete del procesador. El casete ahora se encuentra listo para la incubación.

La biocámara 10 puede llenarse sustancialmente (preferentemente puede llenarse por completo) con el medio de crecimiento, que puede resultar desplazado por las células durante la inoculación. Por ejemplo, la biocámara puede llenarse con aproximadamente 80% del volumen total 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 biocámara puede llenarse no por completo (por ejemplo al 90% del volumen total), de manera que las células puedan distribuirse uniformemente en el interior de la biocámara durante la agitación. Tras la inoculación preferentemente la biocámara se encuentra sustancialmente llena (preferentemente llena por completo).

A continuación, se introduce el casete en el incubador 200, en donde la biocámara se mantiene en posición horizontal para permitir que las células sedimenten por gravedad sobre la superficie inferior de la biocámara, en donde permanecerán durante todo el cultivo. El incubador es un instrumento capaz de aceptar casetes celulares para la producción de células. Puede presentar la forma de una bandeja 210 a la que se encuentre unida una pluralidad de casetes. Se acopla con el casete, proporcionado un control sobre el ambiente de cultivo dentro del casete. También se encuentra conectada con el controlador del sistema 300 y a la clave para almacenar el tiempo y fecha de inicio de la incubación en la clave, y se proporcionan continuamente los datos de incubación a la clave durante la secuencia de incubación. La clave recibe además información sobre sucesos anormales, tales como alarmas o fallos de la alimentación, la cantidad de medio utilizada y la identificación del incubador. El incubador controla el flujo de medio por la cámara de crecimiento, la temperatura del reservorio de medio de crecimiento 68 y la concentración y caudal de los gases administrados en la cámara de gases en la biocámara, basándose en los parámetros de control almacenados en la clave. El incubador monitoriza además diversos parámetros de seguridad/alarma para garantizar que el procedimiento de producción de células funciona de la manera esperada. Lo anterior puede llevarse a cabo para varios incubadores a través del ordenador de control del sistema o mediante la utilización de un ordenador del incubador independiente.

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

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

**EJEMPLOS****5 Ejemplo 1. Protocolos de la técnica de cultivo y lavado de las células de reparación de tejidos (CRT)***Cultivo de las CRT*

10 Las células mononucleares de médula ósea fresca (CMN-MO) aisladas mediante FICOLL<sup>®</sup> procedentes de sangre de donantes normales se obtuvieron de Poietics Inc. (Gaithersburg, MD). Alternativamente, se recibió médula ósea (MO) aspirada en forma de espécimen clínico procedente de pacientes y se separó en FICOLL<sup>®</sup> para crear una preparación de células mononucleares. Se evaluó la concentración celular utilizando un contador celular automático y se cultivaron MNC-MO mediante el método de Lundell *et al.*, indicado anteriormente. Antes de la inoculación, se cebaron las cámaras de cultivo con medio de cultivo que consistía de IMDM, suero de feto bovino al 10%, suero de caballo al 10%, hidrocortisona 5 µM y L-glutamina 4 mM. Se pasó medio por las cámaras de cultivo en un programa de perfusión gradual controlado durante el procedimiento de cultivo de 12 días. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 20% de O<sub>2</sub>.

*Método de lavado CYTOMATE<sup>®</sup>*

20 CYTOMATE<sup>®</sup> es un sistema totalmente automático diseñado para el lavado y la concentración de productos de glóbulos blancos. Incluye un instrumento electromecánico y juegos desechables preesterilizados de solo uso que proporcionan un circuito de lavado para cada lote de células que debe procesarse. Incorpora tecnología de centrifugación de membranas que proporciona un efecto de flujo tangencial para evitar la carga excesiva del filtro con células.

Diseño

- 30 1. Cargar el circuito de lavado en el instrumento CYTOMATE<sup>®</sup>  
 2. Conectar las bolsas:  
 - Bolsa de células recolectadas del procedimiento de cultivo (CRT en 800 a 1.000 ml de volumen de líquidos del procedimiento de cultivo, por ejemplo medio de cultivo, solución enzimática de recolección).  
 - Solución 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 recogido).  
 35 - Bolsa de sobrenadante (2.600 a 3.900 ml de líquido de desecho no recogido con células).

Procedimiento CYTOMATE<sup>®</sup>:

- 40 1) Cebado del circuito de lavado con solución tampón e inicio de la recirculación  
 2) Transferencia de células de la bolsa de recolección al circuito de lavado, reducción del volumen de líquido mediante la recirculación de células por el circuito de lavado, con eliminación simultánea de líquido a través del filtro en el circuito de lavado (el filtro gira para proporcionar un efecto de flujo tangencial y evitar al atoramiento del filtro). El líquido eliminado se recoge en la bolsa de sobrenadante.  
 45 3) Utilización del tampón para enjuagar las células residuales de la bolsa de recolección al circuito de lavado.  
 4) Lavado de las células mediante recirculación de las mismas por el circuito de lavado, eliminando simultáneamente líquido por el filtro giratorio a la bolsa de sobrenadante y añadiendo solución tampón según se requiera para mantener el volumen.  
 5) Transferencia de las células lavadas a la bolsa de recolección.  
 50 6) Utilización del tampón para enjuagar las células residuales de la bolsa de lavado al circuito de recolección.

*Método de recolección de lavado*

El procedimiento de recolección de lavado se inicia mediante el desplazamiento del 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 enzimática de recolección celular (etapa 2, Tabla 8), utilizando la mayor parte del tiempo tripsina porcina. También se han utilizado con éxito otros reactivos de recolección derivados de otros animales, tales como TRYPLE<sup>™</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA) y TRYPZEAN<sup>™</sup> (Sigma, St. Louis, MO). Se deja bajo incubación la cámara de cultivo durante un periodo de tiempo (5 a 60 minutos, preferentemente 15 minutos con la tripsina porcina), ya que el enzima funciona disociando las células unas de otras y de la superficie del cultivo (etapa 3, Tabla 8). Tras completar la incubación enzimática, una segunda solución de enjuague, típicamente de grado inyectable (Isolyte o Normasol) desplaza la solución enzimática (etapa 4, Tabla 8). En este momento la cámara contiene las células desprendidas, que permanecen sedimentadas sobre la superficie celular, y se suspenden con una solución de grado inyectable. Con el fin de incrementar la concentración celular recolectada final y reducir el volumen final, una parte de esta solución de enjuague se desplaza con aire (etapa 5, Tabla 8). Tras alcanzar el volumen final de líquido (100 a 350 ml) en la cámara de cultivo, la cámara se agita con el fin de resuspender las células sedimentadas (etapa 6, Tabla 8). Esta

suspensión celular se drena al interior de 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 puede realizarse una segunda agitación con el fin de enjuagar hacia el exterior cualesquiera células residuales en caso necesario (etapas 8 y 9, Tabla 8). A continuación, este enjuague final se añade al recipiente de recolección celular (etapa 10, Tabla 8).

5

#### *Comparación entre Cytomate y recolección de lavado*

El día de la recolección se dividieron las CRT en dos cultivos. El primer cultivo se recolectó y se concentró siguiendo el procedimiento CYTOMATE® estándar. Las CRT en el primer cultivo se recolectaron mediante tripsinización (tripsina al 0,025% en cloruro sódico al 0,9%) y se lavaron para eliminar los materiales de cultivo utilizando un procesador celular CYTOMATE® (Baxter International, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto celular se lavó 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 se concentró a volúmenes de 15 ó 5 ml en una bolsa biocompatible. El segundo cultivo de CRT se recolectó utilizando una secuencia combinada de procesador ARS de recolección de lavado y un procedimiento modificado de concentración diseñado para reducir adicionalmente los residuos con una etapa adicional de dilución.

10

15

Para crear una suspensión concentrada de CRT, las células recogidas de cada lavado se centrifugaron hasta un volumen de 20 ml y se transfirieron a una bolsa más pequeña, tal como una bolsa Cryocyte. Ya en el recipiente final, se llevó 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  $6 \pm 1,3$  ml, pero hasta 20 ml de solución de grado inyectable según la aplicación final.

20

#### **Ejemplo 2. La recolección de lavado incrementó la calidad de las CRT respecto al lavado CYTOMATE®**

25

Las CRT aisladas utilizando el recolector de lavado presentaban una mayor viabilidad celular, un mayor rendimiento celular, 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 paso por una aguja, niveles más altos de citoquinas antiinflamatorias y niveles más elevados de indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO). Estas mejoras de la población de CRT debido a la utilización del nuevo procedimiento de recolección de lavado permite utilizar la población como agente terapéutico de reparación de tejidos más eficaz que los procedimientos del estado actual de la técnica.

30

#### *Materiales y métodos*

35

##### Recuento/viabilidad celular

Se midió el recuento y viabilidad celulares con un Nucleocounter o mediante exclusión de azul tripán. Se utilizó el protocolo del fabricante para el recuento celular utilizando el Nucleocounter. Brevemente, la suspensión celular se diluyó hasta 100.000 a 10.000.000 células/ml y se utilizó un nucleocasete para aspirar la suspensión celular. Se introdujo el nucleocasete en el Nucleocounter para la tinción de yoduro de propidio automática, incluyendo el recuento y viabilidad celulares. En caso de no disponer de datos del Nucleocounter, se utilizó la exclusión de azul tripán y el hemocitómetro (recuento manual) para obtener el recuento y la viabilidad celulares. Durante el curso de 27 análisis de muestras, los recuentos celulares del Nucleocounter se encontraban dentro de 13% de los recuentos de azul tripán y la viabilidad era del 4% o inferior.

45

Durante estos experimentos, el muestreo del producto en las etapas de procesamiento posteriores al cultivo variaba según los ensayos y otros usos para las células. Se utilizó la estrategia siguiente para obtener los números totales de células viables más exactos a partir de los datos. Se calculó el número total de células de cada muestra obtenida y después ese número se multiplicó por la viabilidad de la siguiente etapa de procesamiento y después se añadió al recuento de células viables en esa etapa. Por ejemplo, en el caso de que se obtuviese una muestra de  $10 \times 10^6$  células en total del producto lavado y la viabilidad de las células tras la concentración fuese de 80%, entonces se habían añadido  $8 \times 10^6$  células viables al recuento viable total del producto concentrado, representando lo que estaría si no se hubiese realizado el muestreo no estándar. Tras calcular los totales no muestreados, se restó el volumen de muestra de fabricación real de 29 ml del número total de células del producto lavado.

50

55

##### Niveles residuales

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

60

##### Protocolo de concentración

Para crear una suspensión concentrada, las células recogidas se centrifugaron hasta un volumen de 20 ml y se transfirieron a una bolsa más pequeña, tal como una bolsa Cryocyte. Ya en el recipiente final, se llevó a cabo una

65

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  $6 \pm 1,3$  ml, pero hasta 20 ml de solución de grado inyectable según la aplicación final. Los volúmenes preferentes para los cultivos concentrados eran de  $6 \text{ ml} \pm 1,3 \text{ ml}$ . Tras extraer las CRT del almacenamiento, los cultivos se descongelaron en un baño de agua circulante a 37°C.

#### Viabilidad celular y % de células CD90<sup>+</sup>

Se midió la viabilidad células y el % de células CD90<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. Las células se lavaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco IX (PBS, Gibco) que contenía 1% de albúmina de suero bovino. Se tiñeron tubos que contenían  $10^6$  células en 0,5 ml sobre hielo con diversas combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados fluorescentemente. Se determinó la viabilidad con 7-amino-actinomicina D (7AAD) (Beckman Coulter). 7AAD sólo entra en células con la membrana comprometida y se une al ADN. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD90 conjugados con PC5 (Thy1) y anti-CD14 conjugado con FITC (Beckman Coulter). Tras 15 minutos, las células se lavaron 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

La expresión de citoquinas por las CRT producidas utilizando el procedimiento de recolección de lavado se determinó cuantitativamente mediante análisis de citometría de flujo intracelular de 2 colores. Brevemente, se incubaron las CRT durante la noche con 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. Se tiñeron las CRT para marcadores de superficie celular mediante la incubación con anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con FITC o Cy5PE (mAb anti-CD14, anti-CD66b, anti-CD90 ó de control). Se definió la subpoblación de linfocitos mediante separación según el tamaño celular basada en la dispersión directa (FSC) y la granularidad basada en la dispersión lumínica lateral (90%) (SSC). A continuación, las células se fijaron utilizando paraformaldehído y se permeabilizaron en saponina antes de la tinción 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 obtuvo en un citómetro de flujo Becton Dickinson FC500.

#### Análisis de frecuencias de UFC

Para los ensayos de unidades formadoras de colonias-fibroblastos (UFC-F), las células se sembraron en 1 ml de LTBMCM en placas de 35 ml de cultivo de tejidos tratadas. Para las CRT, 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 CO<sub>2</sub> en aire. A continuación, las colonias de UFC-F se tiñeron con Wright-Giemsa y las colonias de más de 20 células se contaron como UFC-F.

Para los ensayos de unidades formadoras de colonias -granulocitos/macrófagos (UFC-GM), las células se inocularon en medio de ensayo de colonias que contenía metilcelulosa al 0,9% (Sigma), FBS al 30%, BSA al 1%, 2-mercaptoetanol 100 µM (Sigma), L-glutamina 2 mM (Gibco), 5 ng/ml de PIXY321, 5 ng/ml de G-CSF (Amgen) y 10 U/ml de Epo. Las CRT se sembraron a razón de 1.500 y 3.000 células por ml.

Los cultivos se mantuvieron durante 14 días y se realizó un recuento de las colonias de más de 50 células como UFC-GM.

#### Administración celular mediante agujas

Para someter a ensayo los efectos de la administración con agua sobre los recuentos y viabilidad celulares de CRT, se analizaron muestras de cinco de los productos de recolección de lavado y tres de los productos de lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Estos experimentos de administración sometían a ensayo la capacidad de las células almacenadas de ser administradas en los pacientes sin pérdida de viabilidad o concentración tras pasar por agujas de calibre 25.

Tras 24 horas de almacenamiento a 4°C, las bolsas Cryocyte que contenían CRT se sacaron de la nevera y se resuspendieron y homogeneizaron las CRT para el muestreo. Se recogieron dos muestras de 0,5 ml con una jeringa de 3 ml y se introdujeron en tubos etiquetados como "CRT". A continuación, se introdujeron dos jeringas de 3 ml adicionales en la válvula de llave de paso a 3 vías y se extrajeron 0,5 ml adicionales con la jeringa. A continuación, se enroscaron agujas de calibre veinticinco (1 pulgada y media, BD) en dichas 2 jeringas adicionales (de 3 ml) y se denominaron "aguja de CRT, calibre 25, 1 pulgada y media". A continuación, se midieron las muestras de CRT restantes y se registró el volumen. A estas jeringas de 3 ml se añadieron agujas de calibre 25 (1 pulgada y media) a dos jeringas y agujas de calibre 25 (3 pulgadas, aguja espinal) a las otras dos jeringas. La totalidad de las muestras de la aguja de 0,5 ml en las jeringas de 3 ml con agujas se dispensó utilizando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA) a un caudal de 2,5 ml por minuto o de 0,5 ml en 12 segundos en tubos de fondo redondo

de poliestireno. Tras la administración celular por las agujas, se evaluaron todas las muestras para los recuentos celulares utilizando un Nucleocounter.

Análisis de transferencia western de la expresión deIDO

5 Las CRT expresan un enzima inmunorregulador inducible denominado indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO) que se asocia a la regulación negativa de las respuestas inflamatorias. Las células de reparación de tejidos (CRT) se derivaron utilizando el nuevo procedimiento de recolección de lavado descrito en la presente invención. Tras la recolección, las CRT se incubaron durante 24 horas en medio solo o en medio que contenía 1.000 unidades/ml de interferón- $\gamma$  humano (IFN- $\gamma$ ) recombinante. Se separaron los extractos de proteínas de los lisados celulares totales 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 humano. Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante para la visualización posterior mediante quimioluminiscencia. El presente experimento demuestra una banda característica de 44 kilodaltons (kd) correspondiente específicamente a la expresión de la proteína IDO por las CRT tras la inducción con IFN- $\gamma$ .

*Resultados*

Recuento de células viables totales

20 La figura 11 muestra que la recolección de lavado produjo repetidamente un número más alto de células viables totales tras el lavado que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>, tras restar la muestra de fabricación de 29 ml. Los datos resumidos en la figura 11 procedían de 9 producciones que comparaban el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> con el lavado de hibridación procedentes del mismo donante. Se utilizó reactivo de recolección de Aastrom (tripsina porcina) en la totalidad de estas nueve producciones. El rendimiento medio de células viables totales posteriormente al lavado para el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> fue de  $66,5 \times 10^6 \pm 36,8 \times 10^6$  células viables, mientras que el rendimiento medio de células viables totales posteriormente 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 era dependiente del donante.

Viabilidad

30 La figura 11 demuestra también que la recolección de lavado produjo repetidamente una viabilidad celular más alta posteriormente al lavado que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Se calculó el porcentaje de viabilidad de las células aisladas de los mismos 9 donantes indicados anteriormente. El producto de recolección de lavado mostraba una viabilidad más consistente, con una desviación estándar de 2%, comparado con la desviación estándar de viabilidad del lavado CYTOMATE<sup>®</sup>, de 10%.

Recuento y viabilidad tras el almacenamiento de 24 horas

40 La figura 11 demuestra también que la recolección de lavado produjo repetidamente una viabilidad celular más alta, incluso tras el almacenamiento de 24 horas a 4°C, que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Se midió el porcentaje de viabilidad tras el almacenamiento de 24 horas a 4°C de células procedentes de 5 donantes.

Concentración de BSA posterior al lavado

45 La figura 11 también muestra que la recolección de lavado produjo concentraciones más bajas de BSA residual tras el cultivo de las CRT que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Resultan necesarios niveles bajos de BSA para generar un producto farmacéutico apropiado para la administración en el ser humano.

Viabilidad celular y % de células CD90<sup>+</sup> mediante citometría de flujo

50 La figura 11 muestra que la recolección de lavado produjo repetidamente porcentajes más altos de CRT CD90<sup>+</sup> que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> en células no concentradas. Las células CD90<sup>+</sup> representan células estromales de médula ósea que presentan propiedades de células madre/progenitoras y que resultan útiles para reparar diversos tipos de tejido.

55 La figura 12 muestra que la recolección de lavado produjo repetidamente un número total más alto de CRT CD90<sup>+</sup> viables que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. El número medio de células CD90<sup>+</sup> viables totales en el producto final de recolección de lavado era de  $42,4 \times 10^6 \pm 16,5 \times 10^6$ . El número medio de células CD90<sup>+</sup> viables totales en el producto final de lavado CYTOMATE<sup>®</sup> era de  $19,1 \times 10^6 \pm 10,8 \times 10^6$ .

% de células CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup>

65 Las figuras 12 y 13 muestran que la recolección de lavado produjo repetidamente porcentajes y números totales más altos de CRT CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup> viables que al utilizar el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. El número medio de células CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup> viables totales en el producto concentrado del nuevo lavado en estos seis donantes era de  $34,8 \times 10^6 \pm 9,08 \times 10^6$ . El

número medio de células CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup> viables totales en el producto concentrado del lavado CYTOMATE<sup>®</sup> en estos seis donantes era de  $16,5 \times 10^6 \pm 5,37 \times 10^6$ .

% de células VEGFR1<sup>+</sup>

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

Frecuencia de UFC-F

15 Las figuras 12 y 14 muestran que el procedimiento de recolección de lavado produjo frecuencias de UFC-F comparables con las del lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. La media de la proporción de frecuencias de UFC-F era de 1,03.

Las figuras 13 y 15 muestran que la recolección de lavado produjo un número mayor de UFC-F en cada dosis que el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Las UFC-F totales por dosis se calcularon multiplicando la frecuencia de UFC-F por células por el recuento de células viables totales tras el lavado. Las UFC-F medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado en estos 8 experimentos fue de  $7,26 \times 10^6 \pm 5,22 \times 10^6$ . Las UFC-F medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado CYTOMATE<sup>®</sup> en estos 8 experimentos fue de  $3,01 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$ .

Frecuencia de UFC-GM

25 Las figuras 12 y 16 muestran que la recolección de lavado, en prácticamente cada caso, produjo una frecuencia igual o superior de UFC-GM por dosis que el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. La proporción media de frecuencia de UFC-GM era de 1,37.

30 Las figuras 13 y 17 muestran que la recolección de lavado en prácticamente todos los casos produjo un número total mayor de UFC-GM en cada dosis que el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Las UFC-GM totales por dosis se calcularon multiplicando la frecuencia de UFC-GM por célula por el recuento de células viables totales tras el lavado. Las UFC-GM medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado en estos 6 experimentos fue de  $0,42 \times 10^6 \pm 0,19 \times 10^6$ . Las UFC-GM medias por dosis para el nuevo procedimiento de lavado CYTOMATE<sup>®</sup> en estos 6 experimentos fue de  $0,17 \times 10^6 \pm 0,11 \times 10^6$ .

Administración con aguja

40 La figura 17 muestra que la viabilidad celular del producto de recolección de lavado no muestra un cambio sustancial tras la administración por agujas de calibres 25 y 30. La figura 18 muestra datos similares de los productos de lavado CYTOMATE<sup>®</sup>.

45 Las UFC-F se sometieron a ensayo en células post-administración con aguja del experimento QTRC107000021. La figura 19 muestra las UFC-F por cada 100 células para las tres condiciones. Las CRT de la recolección de lavado presentaban una viabilidad ligeramente más alta que las CRT del lavado CYTOMATE<sup>®</sup>.

Estos datos demuestran la comparabilidad entre los procedimientos respecto a la capacidad de administrar las células mediante agujas al final del procesamiento sin pérdida sustancial de viabilidad celular tras el paso por agujas de calibre pequeño.

Secreción de citoquinas

55 El perfil de secreción de citoquinas por las CRT del lavado CYTOMATE<sup>®</sup> era comparable por célula para prácticamente todas las citoquinas evaluadas para la recolección de lavado. Sin embargo, por dosis unitaria (todas las células que salían del procedimiento), la secreción total de citoquinas por dosis era generalmente más alta de la recolección de lavado (figura 20); de esta manera, como composición concentrada, la población celular era mucho más funcional que la población anterior.

**Tabla 9. Análisis de citometría de flujo de CRT y subpoblaciones de CRT para la expresión intracelular de citoquinas SUBPOBLACIONES DE CRT**

	CRT		CD14 <sup>+</sup> Auto <sup>+</sup>		CD14 <sup>+</sup> Auto <sup>-</sup>		CD66b <sup>+</sup>		CD90 <sup>+</sup>		Linfocitos	
LPS:	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Control:	0,4	0,3										
IL-6:	11	15	6,2	9,2	0,9	1,2	0,6	0,7	1,6		1,1	1,3

	CRT		CD14 <sup>+</sup> Auto <sup>+</sup>		CD14 <sup>+</sup> Auto <sup>-</sup>		CD66b <sup>+</sup>		CD90 <sup>+</sup>		Linfocitos	
IL-10:	6,4	7,9	2,8	4,5	0,4	0,6	0,5	0,4	0,9	0,6	0,1	0,1
IL-12:	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	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 en CRT producidas utilizando la recolección de lavado. 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 CRT producen IL-6 ó IL-10. En contraste, la producción intracelular de IL-12 por las CRT o por subpoblaciones de CRT no era detectable a niveles de tinción superiores a los de fondo observados para anticuerpos de control irrelevantes. IL-12 no era detectable a niveles superiores a los de fondo con independencia de la estimulación con mediadores inflamatorios tales como el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Globalmente, estos datos son altamente consistentes con los perfiles de secreción de citoquinas definidos por los análisis Luminex y ELISA de sobrenadantes de CRT (figura 20), que demuestran una secreción elevada de múltiples citoquinas angiogénicas e inmunomoduladoras en ausencia completa de IL-12 detectable, un mediador proinflamatorio crucial.

Expresión deIDO

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

Expresión de PDL1

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

Sumario

La recolección de lavado crea un producto celular más saludable ( $p < 0,05$ ) en cada estadio (post-lavado, post-concentración y tras 24 horas de almacenamiento), así como menos proteínas séricas residuales ( $p < 0,05$ ) en comparación con el lavado CYTOMATE<sup>®</sup> (figura 11). No se observaron diferencias estadísticas entre los porcentajes de células CD90<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> Auto<sup>+</sup> o VEGFR1<sup>+</sup>, o en las capacidades de formación de colonias F o GM. Por lo tanto, el producto celular presentaba un perfil comparable, aunque mucho más saludable y puro.

**Tabla 10. Resultados estadísticos para la figura 11.**

	Proporción nuevo/Cytomate apareado por donante	Stdev	Actual	Stdev	nuevo	Stdev	Valor de p < 0,05
% de viabilidad post-lavado (n=9)	1,32	0,19	71,6%	9,7%	92,8%	2,2%	X
% de viabilidad post-concentración (n=9)	1,24	0,11	<b>73,7%</b>	6,2%	<b>91,2%</b>	3,7%	X
% de viabilidad tras 24 h de almacenamiento (n=5)	1,32	0,33	<b>66,8%</b>	14,2%	<b>84,5%</b>	3,8%	X
% de células CD90 <sup>+</sup> en el producto final (n=7)	1,07	0,20	<b>28,8%</b>	3,9%	<b>30,1%</b>	13,4%	
% de células CD14Auto <sup>+</sup> en el producto final (n=6)	1,24	0,10	<b>26,0X%&gt;</b>	6,6%	<b>31,7%</b>	6,4%	
% de células VEGFR1 <sup>+</sup> en el producto final (n=5)	1,24	0,21	<b>32,2%</b>	10,7%	<b>38,5%</b>	8,6%	
Frecuencia de UFC-F, producto final (n=3)	0,95	0,25	<b>7,12</b>	3,60	<b>7,07</b>	4,17	
Frecuencia de UFC-GM, producto final (n=3)	1,43	0,65	<b>0,22</b>	0,12	<b>0,27</b>	0,10	
BSA residual, $\mu\text{g/ml}$ (n=11)	0,61	0,27	<b>2,65</b>	0,76	<b>1,51</b>	0,56	X

Considerando el número total de células en el producto final (la dosis final que resulta del procedimiento), se observó un número estadísticamente mayor de células viables totales, de células CD90<sup>+</sup> viables totales y de células CD14<sup>+</sup>Auto<sup>+</sup> viables totales (dos células que secretan citoquinas inmunomoduladoras).

5

**Tabla 11. Resultados estadísticos para la figura 12.**

	Proporción nuevo/Cytomate apareado por donante	Stdev	Actual (promedio)	Stdev	Nuevo (promedio)	Stdev	Valor de p < 0,05
Número total de células viables post-lavado (n=9)	1,91	0,72	<b>95,0E<sup>6</sup></b>	47,5E 6	<b>161,1E<sup>6</sup></b>	57,3E <sup>6</sup>	X
Número total de células viables en el producto final (n=9)	2,42	1,17 7	<b>58,3E<sup>6</sup></b>	32,2E <sup>6</sup>	<b>113,9E<sup>6</sup></b>	38,6E <sup>6</sup>	X
Número total de células CD90 <sup>+</sup> en el producto final (n=7)	1,98	0,49	<b>18,8E<sup>6</sup></b>	8,9E <sup>6</sup>	<b>34,6E<sup>6</sup></b>	10,5E <sup>6</sup>	X
Número total de células CD14Auto <sup>+</sup> en el producto final (n=6)	2,16 6	0,40	<b>20,4E<sup>6</sup></b>	5,4E <sup>6</sup>	<b>43,2E<sup>6</sup></b>	11,7E <sup>6</sup>	X
Número total de células VEGFR1 <sup>+</sup> en el producto final (n=5)	2,12	0,40	<b>26,0E<sup>6</sup></b>	13,1E <sup>6</sup>	<b>53,9E<sup>6</sup></b>	26,4E <sup>6</sup>	
UFC-F por dosis, producto final (n=3)	1,71 1	0,68	<b>5,8E<sup>6</sup></b>	3,8E <sup>6</sup>	<b>8,9E<sup>6</sup></b>	4,1E <sup>6</sup>	
UFC-GM por dosis, producto final (n=3)	2,64	1,46					

La recolección de lavado produjo CRT con una mayor viabilidad y niveles residuales más bajos del cultivo celular. Ello permitió recolectar un mayor número de CRT de cada cultivo.

- 10 Además, la recolección de lavado produjo CRT con porcentajes incrementados de células CD90<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> Auto<sup>+</sup> y VEGFR1<sup>+</sup> en comparación con las CRT aisladas utilizando el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Además, la recolección de lavado produjo CRT que secretaban más citoquinas antiinflamatorias por dosis celular, incluyendo IL-1ra, IL-10 e IL-6 y proteínas con efectos antiinflamatorios como IDO y PDL1. Además, las CRT no expresan citoquinas proinflamatorias cruciales como IL-12. Ello demuestra que las CRT aisladas mediante el método de recolección de lavado presentan un mayor potencial de reparación de tejidos y antiinflamatorio debido al mayor porcentaje de células estromales de médula ósea, células endoteliales y monocitos/macrófagos.

15 Además, la técnica de recolección de lavado produjo consistentemente más UFC que la técnica de lavado CYTOMATE<sup>®</sup>. Lo anterior demuestra que las CRT producidas mediante la técnica de recolección de lavado presentan un mayor número de células progenitoras y madre que las CRT producidas mediante la técnica de lavado CYTOMATE<sup>®</sup>.

20 Además, la recolección de lavado produce CRT que no pierden viabilidad sustancial al pasarlas por una aguja de calibre 25 ó 30, lo que puede resultar necesario para la administración terapéutica. Las CRT de la recolección de lavado funcionaron aproximadamente igual, o ligeramente mejor que las CRT producidas utilizando el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>.

**Ejemplo 3. Potencial de reparación ósea mejorado de CRT de la recolección de lavado basada en un número incrementado de células CD90<sup>+</sup>**

30 Se evaluó el potencial formador de hueso u osteogénico de las células mononucleares de médula ósea (CMN-MO) no expandidas y de las CRT utilizando un ensayo *in vitro* de diferenciación ósea. Brevemente, las CRT aisladas utilizando el procedimiento de recolección de lavado se cultivaron durante hasta 3 semanas en placas de 35 mm que contenían medio de control (OS<sup>-</sup>) (DMEM con FBS al 10%) o medio osteogénico (OS<sup>+</sup>) (DMEM que contenía FBS al 10%, dexametasona 100 nM, β-glicerofosfato 10 mM y L-ascorbato-2-fosfato 0,05 mM) a una concentración de 35 10.000 a 20.000 células por cm<sup>2</sup>. Se evaluó la diferenciación osteogénica a partir de la morfología celular, la expresión de la fosfatasa alcalina (FA) y la formación de una matriz mineralizada mediante deposición del calcio. Se cuantificó la actividad de FA presente en el cultivo diferenciado, utilizando el kit AttoPhos (Promega), una conversión catalizada enzimáticamente de la forma fosfato del sustrato AttoPhos en BBT, y midiendo la absorbancia a 435 nm y a 555 nm. La actividad enzimática se expresa como unidades de actividad de FA. Se cuantificó el calcio siguiendo el 40

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 microcentrífuga. 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 microcentrífuga, 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<sup>+</sup> de los productos CRT utilizando Epics Altra (Beckman Coulter) y se sembraron en placa para el potencial osteogénico, tal como se ha indicado anteriormente. Se presentan los datos de deposición media de calcio ± SEM de tres experimentos para cada población celular.

Se midió la frecuencia de células CD90, de células CD15 y el potencial osteogénico *in vitro* para las CRT obtenidas del procedimiento CYTOMATE<sup>®</sup>, del procedimiento de recolección de lavado según la invención y de células madre mesenquimales (CMM) obtenidas del mismo donante de médula ósea. Se cultivaron las CMM en medio DMEM con FBS al 10%. Resulta importante que el cultivo de CMM incluía la eliminación de las células accesorias no adherentes prácticamente al inicio del cultivo, y el posterior cultivo y pase de la población adherente al plástico. A continuación, se cultivaron las CMM y CRT en medio inductivo osteogénico durante hasta 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 el presente estudio los presentes inventores evaluaron el potencial osteogénico de las CMN primarias y de primer pase en comparación con las CRT.

Los estudios anteriores con CRT de CYTOMATE<sup>®</sup> han demostrado que: 1) el potencial osteogénico de las CRT es mucho mayor que el de las CMN-MO, y 2) el potencial osteogénico de las CRT reside en la fracción CD90<sup>+</sup> de las células (Tabla 12).

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

Población celular	Promedio de calcio depositado (µg/placa)
CMN-MO	1.094 ± 893
CRT	17.943 ± 2.864
CD90 <sup>+</sup>	7.260 ± 2.118
CD90 <sup>-</sup>	13 ± 11

A continuación, se compararon directamente para el potencial osteogénico las CRT de CYTOMATE y de la recolección de lavado según la técnica de la invención. Mediante la medición de la deposición de calcio, los resultados demuestran que, de promedio, el potencial osteogénico era 2 veces más alto con la dosis de CRT de recolección de lavado (Tabla 13, figura 21).

**Tabla 13. El potencial osteogénico por dosis unitaria es mayor para la nueva recolección de lavado**

Nº de exp.	CYTOMATE	Nueva recolección de lavado	Proporción nuevo:Cytomate
QTRC107000094	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
QTRC107000097	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

Se comparó el potencial osteogénico de las CRT con el potencial de otro tipo celular, las CMM, las cuales se ha demostrado en la literatura que presentan potencial osteogénico. Se cultivaron las CMM en ausencia de células accesorias y son un tipo celular mucho más purificado. Se encontró previamente que las CRT presentan un potencial osteogénico más alto que las CMM por cada célula CD90. Se llevaron a cabo experimentos posteriores para verificar que las CRT de la nueva técnica de recolección de lavado mostraban la misma tendencia. En un experimento representativo mostrado en la presente memoria, la frecuencia global de células CD90<sup>+</sup> era mucho más baja en las CRT (16%) que en las CMM (99%). Sin embargo, la frecuencia de las células doblemente positivas CD15<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> (Tabla 9) y el potencial osteogénico (Tabla 9, figura 22) eran mucho más altos en las CRT. Se midió el potencial osteogénico mediante deposición del calcio (Ca) (figura 22A) y la actividad de fosfatasa alcalina (FA) (figura 22B) y era prácticamente 2 veces más alta en las CRT que en las CMM primarias (P0) por cada célula CD90. El pase adicional de las CMM condujo a una actividad todavía más baja. Estos resultados son consistentes con los experimentos pasados.

Estos datos demuestran que la composición de CRT, concretamente las células CD90<sup>+</sup>, que eran producidas con la recolección de lavado eran más potentes que las CMM en cuanto al potencial osteogénico. Las células CRT CD90<sup>+</sup> también expresan el marcador CD15 en mayor grado que las células CMM CD90<sup>+</sup>.

**Tabla 14. Comparación entre las CRT y las CMM: fenotipo y función**

				Potencial osteogénico por cada 10 <sup>5</sup> células CD90 <sup>+</sup>	
Condición	% de CD90 <sup>+</sup>	% de CD15 <sup>+</sup>	% de CD90 <sup>+</sup> CD15 <sup>+</sup>	Deposición de Ca <sup>2+</sup> (µg)	Actividad de FA (nmoles de p-nitrofenol)
CRT (lavado Cytomate)	19,92	35,29	14,37	n.d.	n.d.
CRT (lavado de recolección)	16,42	32,17	13,51	9,32	99,739
CMM (P0)	98,56	1,10	1,07	4,83	59,268
CMM (P1)	98,55	0,11	0,10	0,53	23,413
n.d. = no determinado					

5 Los datos directos de comparación de las CRT de recolección de lavado frente a las CRT del lavado CYTOMATE<sup>®</sup> demuestran que los productos de CRT de recolección de lavado presentan un mayor potencial osteogénico. La presencia de CD15 sobre las células CD90<sup>+</sup> distingue las CRT de otros productos celulares purificados (tales como CMM) y se correlaciona con un potencial osteogénico mejorado de las CD90.

10 **Ejemplo 4: Ensayos clínicos: cicatrización ósea sin inflamación con CRT aisladas utilizando el lavado CYTOMATE<sup>®</sup>**

*Fractura de hueso largo - España*

15 Se llevaron a cabo dos estudios de fracturas de hueso largo en centros en España, bajo la aprobación de comité ético. Un ensayo clínico de fase I en el Hospital General de l'Hospitalet, Centro Médico Teknon y Hospital de Barcelona-SCIAS incluía cinco pacientes y trató sus fracturas no unidas de hueso largo. Una tercera parte independiente realizó una revisión utilizando imágenes radiográficas (figura 35) o mediante observación clínica de la totalidad de los cinco pacientes, con un total de seis fracturas tratadas, informando de que todas habían cicatrizado.

20 La figura 35 muestra el resultado clínico de un paciente que había caído de un andamio y se había fracturado ambas tibias. La cicatrización no se produjo en ninguno de los dos hueso tras la primera cirugía. Se llevó a cabo una segunda cirugía utilizando CRT y un portador de matriz cerámica. Tras 6 meses ambas líneas de fractura y cierta cantidad de matriz son visibles bajo rayos X. A los 12 meses, la línea de fractura ha desaparecido y el paciente se ha curado, aunque todavía puede observarse cierta cantidad de material residual de la matriz. A los 18 meses (no  
25 mostrado), la matriz ha sido totalmente reabsorbida y el paciente ha vuelto a trabajar, en una cantera.

No se observaron sucesos adversos relacionados con las CRT. Se utilizó el producto de CRT en este estudio temprano. En los pacientes se implantó material de matriz CALCIBON<sup>®</sup> (gránulos de fosfato de calcio) mezclado con células CRT y ligado con plasma autólogo para incrementar las propiedades de manipulación. Éste fue el primer  
30 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 una solicitud de calificación de producto medicinal en fase de investigación (PEI), la presentación requerida en la Unión Europea (UE) para un ensayo clínico, y se obtuvo permiso de la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) para iniciar un ensayo de fracturas no unidas de fase II en España. En  
35 este estudio se ha completado el tratamiento con CRT de la totalidad de 10 pacientes.

En dicho estudio se utilizaron las CRT de la presente invención. En los pacientes se implantaron partículas de matriz VITOSS<sup>®</sup> (β-TCP) mezcladas con CRT y ligadas con plasma para facilitar la manipulación.

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

*Reconstrucción maxilofacial:*

Se completó un ensayo de control de viabilidad clínica de regeneración del hueso de la mandíbula (maxila) en Barcelona, España, para pacientes edéntulos con pérdida ósea severa que requerían un procedimiento de elevación del seno de manera que pudieran colocarse implantes dentales. Este ensayo de viabilidad incluyó los 5 pacientes diana para la evaluación de la regeneración ósea resultante de las CRT en comparación con un procedimiento estándar de injertación ósea. En los pacientes se implantaron partículas de matriz BIOOSS® (hueso bovino) mezcladas con CRT y ligadas con plasma autólogo. Cuatro meses después de la terapia celular, los tratamientos en que se habían incluido CRT mostraban menor hinchazón y un incremento significativo de la altura 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 los pacientes tratados con CRT*

Los ensayos clínicos iniciales de fase I/fase II para evaluar las CRT para la cicatrización de fracturas no unidas de huesos largos y la reconstrucción del hueso de la mandíbula han demostrado una reparación ósea significativa con hinchazón, dolor, rojez e inflamación postoperatorias reducidas en las 24 horas posteriores a la operación. Ésta era una observación inesperada fuera del alcance de los ensayos y que se realizó en Barcelona y en múltiples sitios de E.E.U.U. en pacientes que habían recibido terapia de CRT.

Esta observación ha conducido a estudios preclínicos adicionales centrados en la caracterización de la función inmunomoduladora o antiinflamatoria de la mezcla de CRT. Los resultados de estos estudios demuestran que las CRT expresan un perfil inmunomodulador para la regeneración y reparación óptimas del tejido con una inflamación mínima. Más concretamente, las CRT contienen una mezcla de tipos celulares que expresan actividad regenerativa de los tejidos e inmunomoduladora, incluyendo macrófagos alternativamente activados (CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>), células madre mesenquimales (CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>), células T reguladoras (CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) y otros linfocitos. En particular, los linfocitos CD3<sup>+</sup> producen niveles elevados de IL-10, una citoquina inmunomoduladora, tras la inducción con el complejo de receptor de células T-CD3 (figura 23-C). Las CRT también expresan varias potentes citoquinas inmunorreguladoras, incluyendo FCH, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-6, IL-10, TGF-β y MCP-1 al nivel tanto génico como de las proteínas. Las CRT no expresan, o expresan a niveles muy bajos, los mediadores proinflamatorios cruciales, incluyendo IL-1, IFNγ, TNFα y más notablemente IL-12, tanto al nivel génico como proteico. Las CRT son inducibles para la expresión de un enzima regulador inmunológico clave denominado indolamín-2,3-dioxigenasa (IDO). Se ha implicado la IDO mecanísticamente en la regulación negativa de las respuestas inflamatorias tanto nacientes como actuales. Además, las CRT demuestran una actividad estimuladora reducida en 10 a 50 veces en la reacción de linfocitos alo-mixta (RLA) en comparación con las células presentadoras de antígeno profesionales, evaluando el potencial de activación de las respuestas inflamatorias adaptativas o mediadas por células T.

En conjunto, estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que las CRT polarizan o alejan fuertemente la respuesta del huésped de la inflamación destructora de tejido y hacia la reparación de lesiones, con una cicatrización más rápida de los tejidos dañados.

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

Un paciente de fractura no unida en el ensayo de E.E.U.U. no colaborador, fumador y que soportaba peso en la pierna en cicatrización de manera prematura, resultando en una rotura de la fijación interna y un nuevo callo a los 3 meses. Al sustituir la placa, se extrajeron biopsias de la parte media del callo, se fijaron y se procesaron para la inclusión en metacrilato de metilo y secciones teñidas calcificadas. La histología cualitativa mostraba hueso tejido en el exterior del callo. En el interior, se observó hueso lamelar sobre la superficie de partículas de la matriz aloinjertada o en sustitución del aloinjerto (figura 32). La médula era fibrosa y muy bien vascularizada, con vasos arteriales maduros y venulares de tipo sinusoidal. Algunos vasos pequeños aparentemente cortan a través de partículas de aloinjerto. Se observaron osteoclastos, indicativos de remodelado ósea, sobre las superficies óseas en dichas regiones en ocasiones raras. La mayoría de superficies se encontraban revestidas con 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 no era maduro ni se encontraba totalmente mineralizado. Este caso mostraba una inducción ósea muy temprana y cicatrización, aunque el callo todavía requería tiempo para mineralizarse para recuperar resistencia biomecánica.

La figura 32 muestra la histología del callo de cicatrización. La figura 32A muestra osteoblastos y hueso nuevo, ya que el osteoide cubre la mayoría de superficies de hueso y aloinjerto. Observar los vasos sanguíneos y la médula fibrosa. Las fotomicrografías de campo brillante (figura 32B) y polarizadas (figura 32C) de la misma sección muestran vasos sanguíneos que penetran en el aloinjerto de MOD (matriz ósea desmineralizada; lamelas paralelas) y en hueso nuevo tejido 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 CRT presentan la capacidad de formar vasos sanguíneos pequeños y ensayos de terceras partes que implicaban la utilización de células de médula ósea para enfermedad vascular periférica, se inició un ensayo para evaluar la seguridad y eficacia de las CRT en el tratamiento de diabéticos con heridas abiertas e isquemia crítica de extremidades. Aastrom firmó un acuerdo de ensayo clínico con la Heart & Diabetes Center situada en Bad Oeynhausen, Alemania, para llevar a cabo un ensayo piloto para evaluar la seguridad y potencial eficacia de las CRT en la mejora de la circulación periférica en pacientes diabéticos con heridas abiertas e isquemia crítica de extremidades. Se incluyeron pacientes que presentaban una herida abierta que no había cicatrizado y que no mostraban ninguna tendencia a cicatrizar durante por lo menos las 6 semanas previas a la inclusión. La inclusión de pacientes hasta alcanzar los 30 pacientes continúa todavía. Los investigadores informaron de que los pacientes tratados con CRT 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 brazo de estándar de cuidados actual del presente ensayo demostró la falta de cicatrización de las heridas abiertas.

Doce meses después del tratamiento todos los pacientes en el análisis preliminar que habían sido tratados con CRT no informaron de ninguna amputación mayor, de ningún suceso adverso relacionado con las células y de cicatrización de todas las heridas abiertas. Para los dos pacientes de estándar de cuidados que sólo recibieron cuidados (no células) de las heridas, un paciente sufrió una amputación mayor y un paciente no experimentó ninguna mejora en la cicatrización de las heridas tras 12 meses.

*Reparación ósea*

Se inició un ensayo para evaluar la seguridad y la eficacia de las CRT en el tratamiento de la osteonecrosis. Aastrom firmó un acuerdo de ensayo clínico con el Orthopedic Institute, Konig-Ludwig-Haus en la Universidad de Wurburg, en Alemania, situada en Bad Oeynhausen, Alemania, con el fin de llevar a cabo un ensayo piloto con el fin de evaluar la seguridad y potencial eficacia de las CRT 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 médula en la cabeza del fémur y en muchos casos conduce a la sustitución total de cadera. Cuatro pacientes fueron tratados con CRT en el estudio inicial. Todos los pacientes toleraron bien el procedimiento, informaron de una reducción del dolor de cadera sin signos de progresión de la enfermedad, según se determinó mediante RMI y radiográficamente, 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 sustitución de cadera.

*Mezcla de CRT y matriz ósea desmineralizada (MOD) en la clínica*

El cirujano recibe una bolsa de suspensión de células CRT y añade esta solución a una cantidad premedida de MOD en una placa de mezcla suministrada. A continuación, la mezcla de CRT/MOD se liga con el plasma del paciente para crear un implante sólido (figura 33A) con propiedades de manipulación mejoradas. Aastrom ha realizado un desarrollo extensivo de formulación y del procedimiento para obtener la calificación de este procedimiento y está segura de que las células siguen siendo viables y funcionales durante este procedimiento de mezcla (figuras 33B y 34B, posteriormente).

La figura 33A muestra una mezcla implantable de CRT/MOD que ha sido ligada con plasma autólogo. Las CRT siguen siendo viables dentro de la mezcla, tal como puede observarse en la fotomicrografía 4X de tinción Live/Dead a las 24 horas (figura 33B).

Las figuras 34A y B muestran que las CRT dentro de la mezcla de aloinjerto/plasma son viables tras la mezcla y que son capaces de proliferación extensiva, tal como puede observarse por el metabolismo creciente durante 2 semanas. Observar el gran incremento de densidad celular en las fotomicrografías entre los días 1 (figuras 29B, parte superior) y el día 14 (figura 34B) (ambas a 4X).

La figura 35 muestra que las CRT siguen siendo funcionales dentro de los constructos de MOD/plasma y que mantienen una secreción importante de citoquinas durante un periodo de cultivo de 2 semanas.

En conjunto este grupo de datos clínicos con CRT lavadas con Cytomate<sup>®</sup> demuestra los aspectos osteogénico, vasculo/angiogénico y antiinflamatorio/inmunomodulador del producto de células mixtas de CRT. La nueva composición de materia que proporciona células de viabilidad y número estadísticamente superior, especialmente en los linajes de células madre/progenitoras/endoteliales conduce a un producto clínico más funcional. Las nuevas CRT de recolección de lavado han sido optimizadas para su capacidad de fabricación y función, y presentan propiedades de reparación de tejidos superiores a las de los productos celulares clínicos utilizados previamente.

**Ejemplo 5: Entre las CRT aisladas utilizando el método de recolección de lavado se incluyen células T reguladoras que secretan la citoquina antiinflamatoria IL-10.**

Se evaluaron mediante citometría de flujo las células de reparación de tejidos producidas utilizando el procedimiento de recolección de lavado. Las células recolectadas se tiñeron para el análisis de dos colores utilizando mAb de control irrelevantes de isotipos correspondientes (IgG1, IgG2a) (figura 23A) o mAb específicas anti-CD25 más anti-CD4 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<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>, un fenotipo de superficie asociada 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 dentro de la mezcla de CRT. Se incubaron las CRT solas o en presencia de mAb anti-CD3 inmovilizado en plástico (100 ng/ml) como estímulo policlonal de la activación de las células T. Las concentraciones de citoquinas en los líquidos sobrenadantes a las 48 horas se determinaron mediante el 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 CRT tras la activación por anticuerpo monoclonal anti-CD3. IL-10 es una citoquina inmunomoduladora producida característicamente por las células T reguladoras y los macrófagos inmunomoduladores.

### **Ejemplo 6: Las CRT liberan FCH, una citoquina inmunomoduladora y angiogénica**

El factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) es una citoquina inmunomoduladora y angiogénica derivada del mesénquima que actúa como mediador en la formación vascular, en la endotelización y en la maduración vascular, incluyendo la migración y reclutamiento de células perivasculares, tales como células de músculo liso y pericitos. La FCH suprime la fibrosis tras la lesión de tejidos. Esta citoquina induce la diferenciación de los monocitos hacia una función celular accesoria inmunorreguladora y tolerogénica. Resulta interesante que la FCH también se ha demostrado que reduce el rechazo agudo y crónico del aloinjerto, sugiriendo un potencial mecanismo antiinflamatorio.

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

Se evaluaron las CRT en una respuesta alogénica de leucocitos mixtos (RALM) 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- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inducen una expresión elevada por las CRT de enzimas inmunomoduladores, incluyendoIDO (figuras 24, 25 y 27) y de otros ligandos inmunoinhibidores tales como PD-L1 (figura 28). Por lo tanto, se incubaron CRT con (inducidas) o sin (no inducidas) 1.000 unidades/ml de interferón humano recombinante durante las 24 horas previas a la adición a la RALM. Tras la exposición a IFN- $\gamma$ , se irradiaron las CRT (2.000 Rad) y se incubaron en la RALM en un abanico de dosis celulares consistente de 2.000, 10.000 ó 50.000 CRT conjuntamente con una dosis fija de 10<sup>5</sup> células T alogénicas respondedoras por cada micropocillo en cultivos por triplicado. Se evaluó la proliferación de las células T mediante incorporación de <sup>3</sup>H-timidina mediada en pulsos por minuto (cpm) el día 6 de cultivo. Tal como se muestra en la figura 30, las CRT demostraron una sorprendente reducción a niveles de fondo de la actividad estimuladora de células T tras una exposición breve a mediadores inflamatorios tales como IFN- $\gamma$ . Estos datos indican una actividad reducida o potencialmente inhibidora de las CRT contra las respuestas inflamatorias mediadas por células T.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para procesar células en cultivo, que comprende:  
proporcionar una biocámara para el cultivo de células,  
proporcionar un medio de cultivo para el cultivo de células dentro de la biocámara,  
inocular la biocámara con células,  
cultivar las células,  
10 tras un periodo de tiempo de cultivo predeterminado, desplazar el medio de cultivo de la biocámara con una primera  
solución de enjuague biocompatible,  
sustituir la primera solución de enjuague por una solución enzimática de recolección celular seleccionada del grupo  
consistente en tripsinas, colagenasas, enzimas de origen microbiano, agentes de disociación, proteasas o mezclas  
de los mismos; e  
15 incubar el contenido de la biocámara durante un periodo de tiempo predeterminado, en el que durante la  
incubación, el enzima por lo menos disocia las células unas de otras y/o de la superficie de la biocámara, y desplazar  
la solución enzimática con una segunda solución de enjuague, en la que, al desplazar el enzima, la cámara se llena  
sustancialmente con la segunda solución de enjuague.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en el que la segunda solución de enjuague comprende una solución capaz de  
inyectarse en un ser humano.
- 25 3. Método para procesar células en cultivo según la reivindicación 1, que comprende además:  
desplazar una parte de la segunda solución de enjuague con un gas con el fin de obtener un volumen reducido  
predeterminado de líquido en la cámara.
- 30 4. Método para procesar células en cultivo según la reivindicación 1, que comprende además agitar la cámara para  
resuspender las células sedimentadas.
- 35 5. Método para procesar células en cultivo según la reivindicación 1, que comprende además drenar la solución con  
células en suspensión hacia el interior de un recipiente de recolección de células.
6. Método para procesar células en cultivo según la reivindicación 1, que comprende además añadir una cantidad  
adicional de la segunda solución a la biocámara y agitar la biocámara para enjuagar las células residuales hacia el  
exterior.
- 40 7. Método para procesar células en cultivo según la reivindicación 6, que comprende además drenar la solución  
hacia el interior de un recipiente de recolección de células.
8. Método según la reivindicación 1, en el que el caudal para la introducción de soluciones y/o gases añadidos a la  
biocámara es de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 1,0 intercambios de volumen/min.
- 45 9. Método según la reivindicación 1, en el que el caudal para la introducción de soluciones y/o gases añadidos a la  
biocámara es de entre aproximadamente 0,50 y aproximadamente 0,75 intercambios de volumen/min.
- 50 10. Método según la reivindicación 1, en el que los líquidos/soluciones o gases se introducen en la biocámara según  
un flujo de pistón radial.
11. Método según la reivindicación 1, en el que dichas células se derivan de células mononucleares.
- 55 12. Método según la reivindicación 11, en el que dichas células mononucleares son de médula ósea, sangre  
periférica, sangre de cordón umbilical o hígado fetal.
13. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cultivo produce una población celular mixta en la que más de  
5% de la población celular es CD90<sup>+</sup>.
14. Células en cultivo producidas según el método según la reivindicación 1.
15. Composición que comprende las células en cultivo según la reivindicación 14.

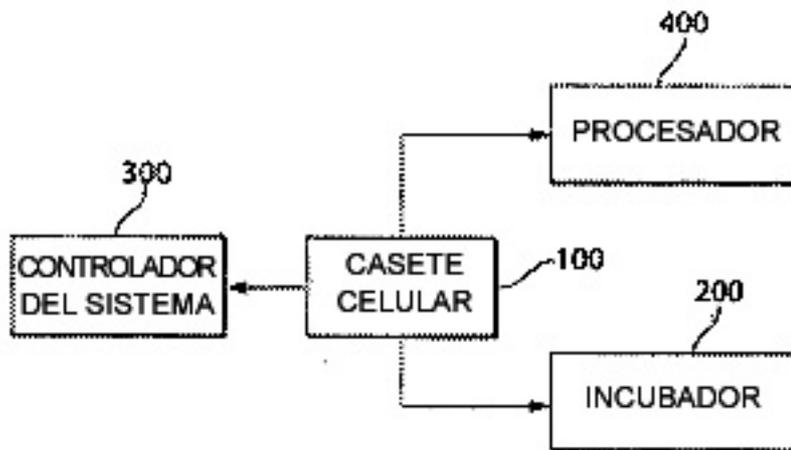


Fig. 1

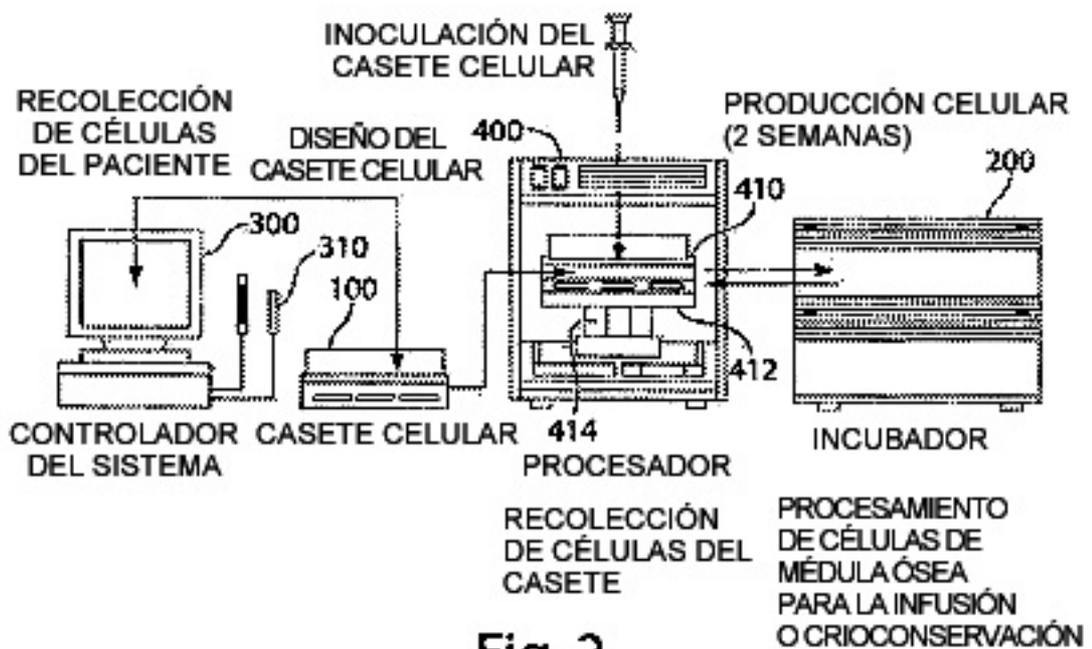


Fig. 2

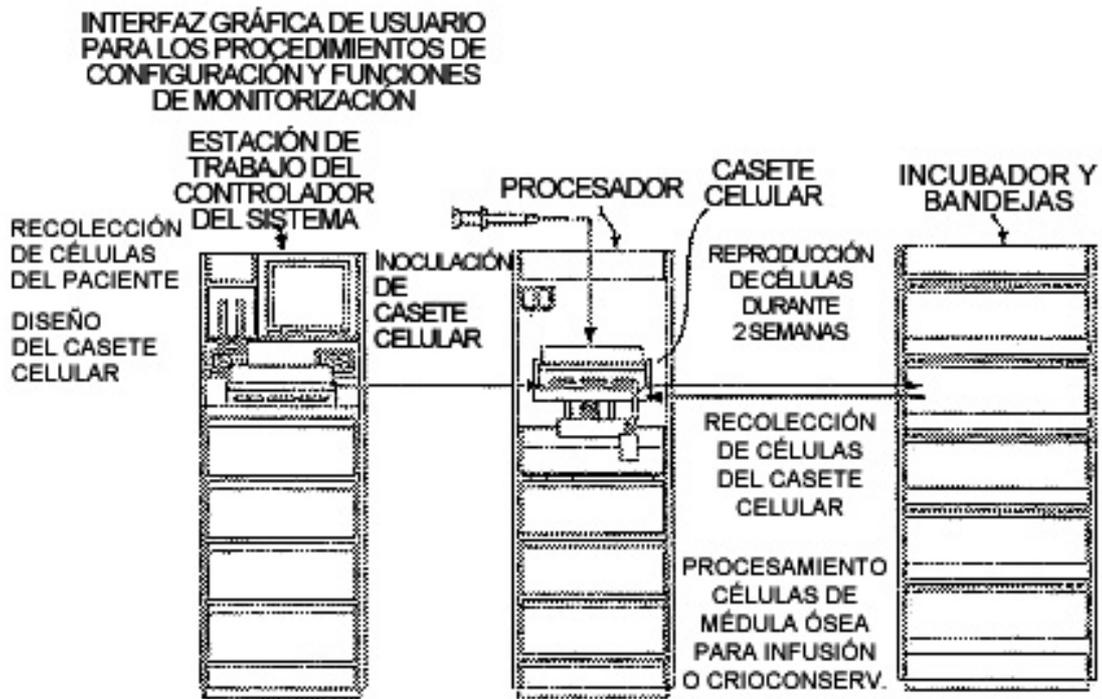


Fig. 3

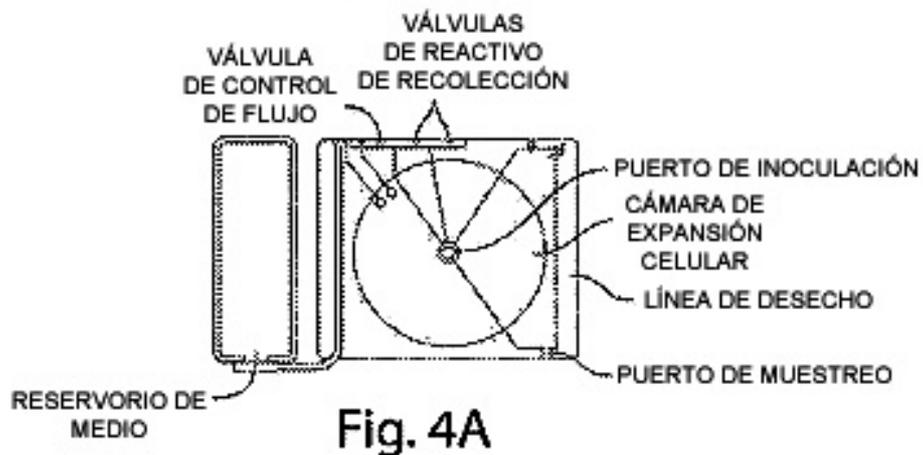


Fig. 4A

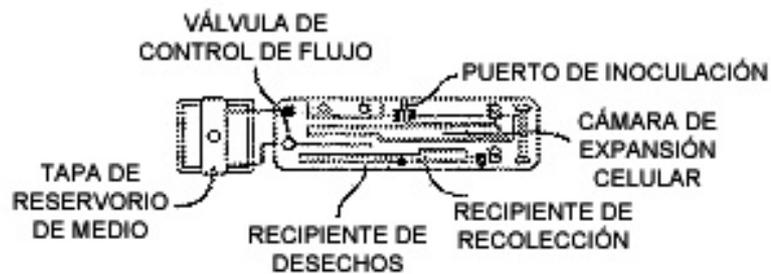


Fig. 4B

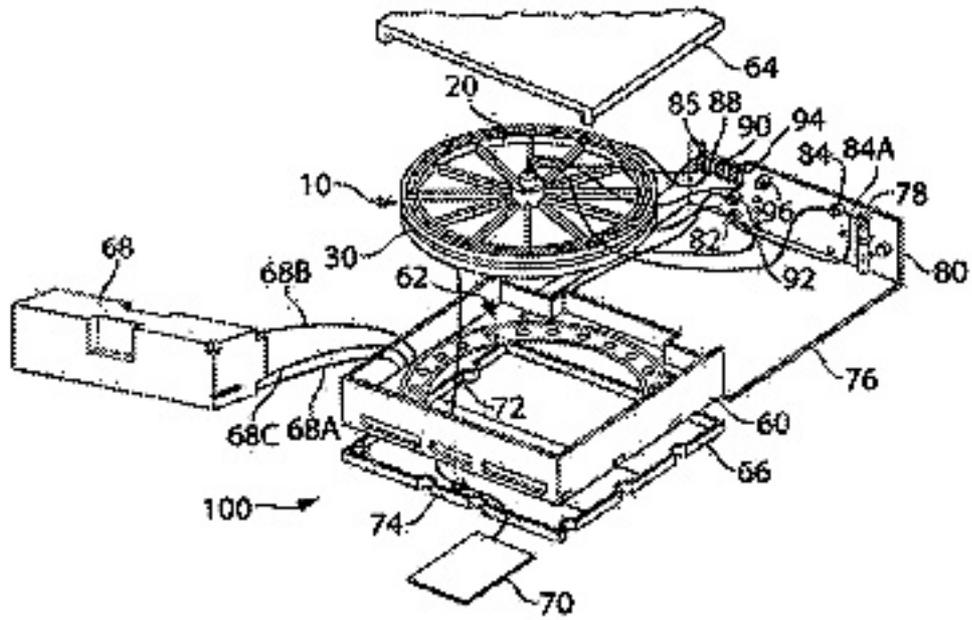


Fig. 5

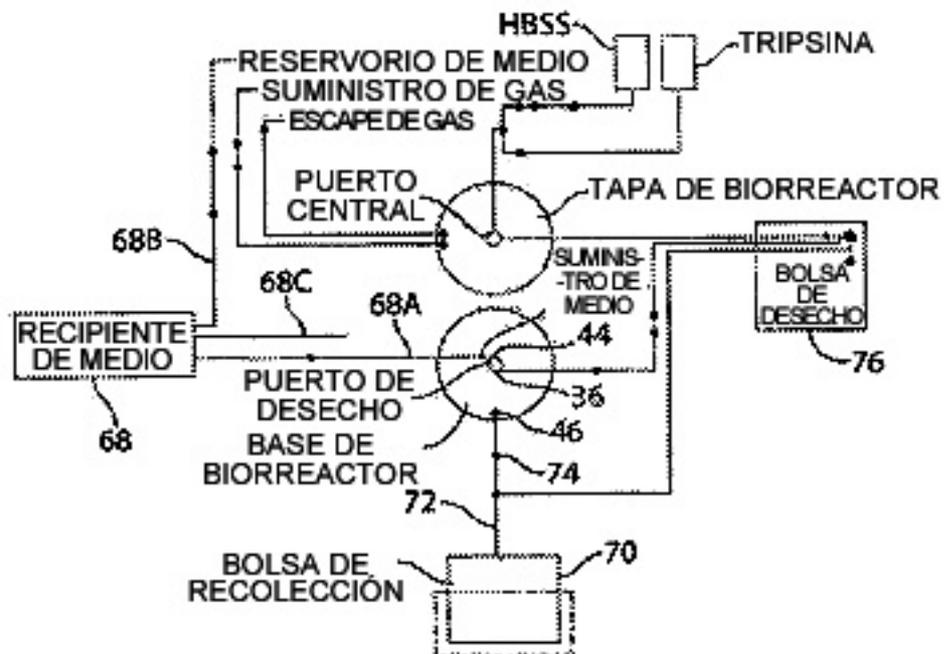


Fig. 6

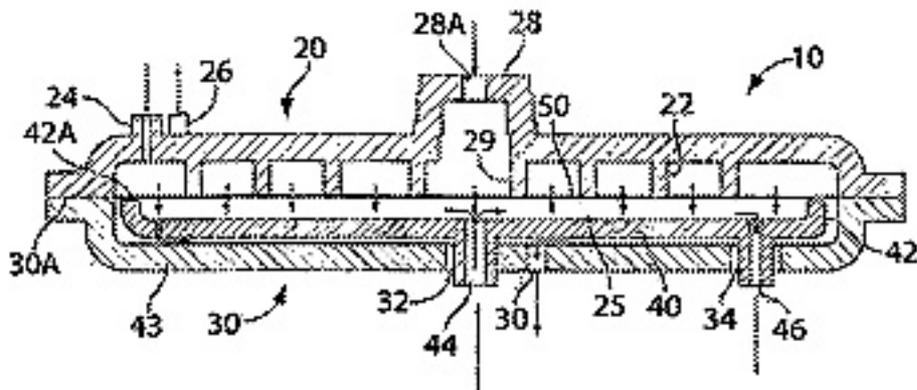


Fig. 7

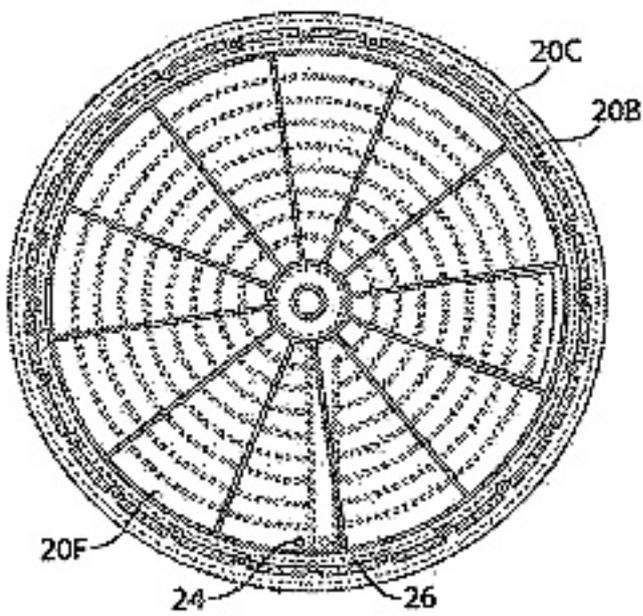


Fig. 8A

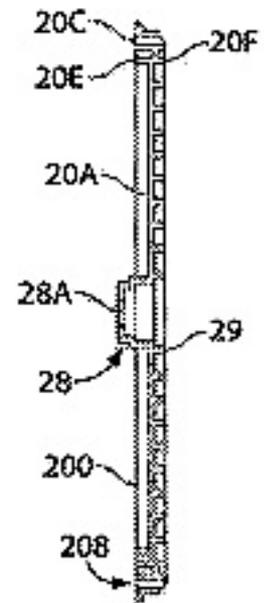


Fig. 8B

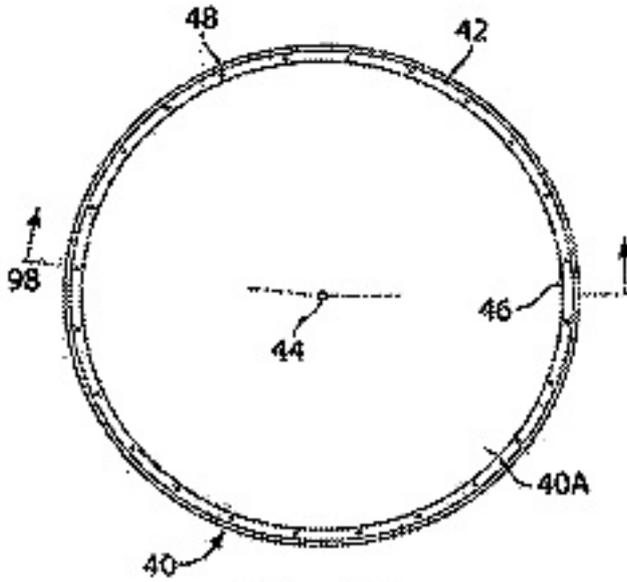


Fig. 9A

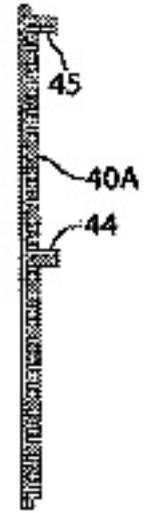


Fig. 9B

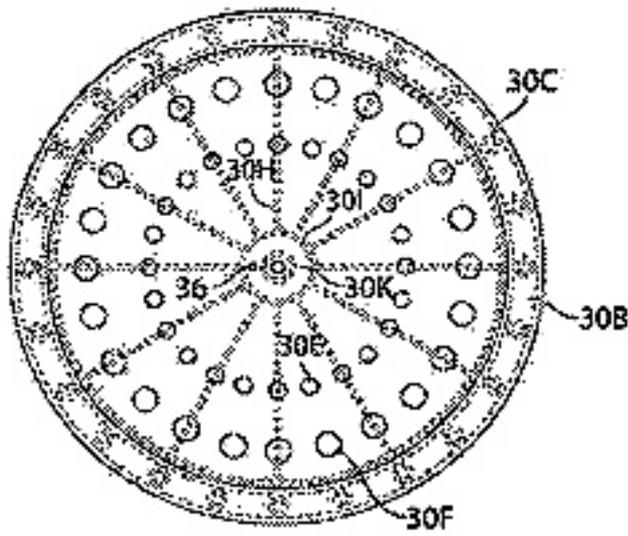


Fig. 10A

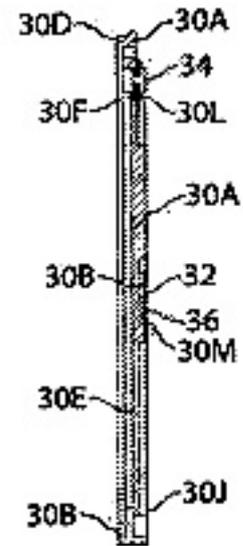
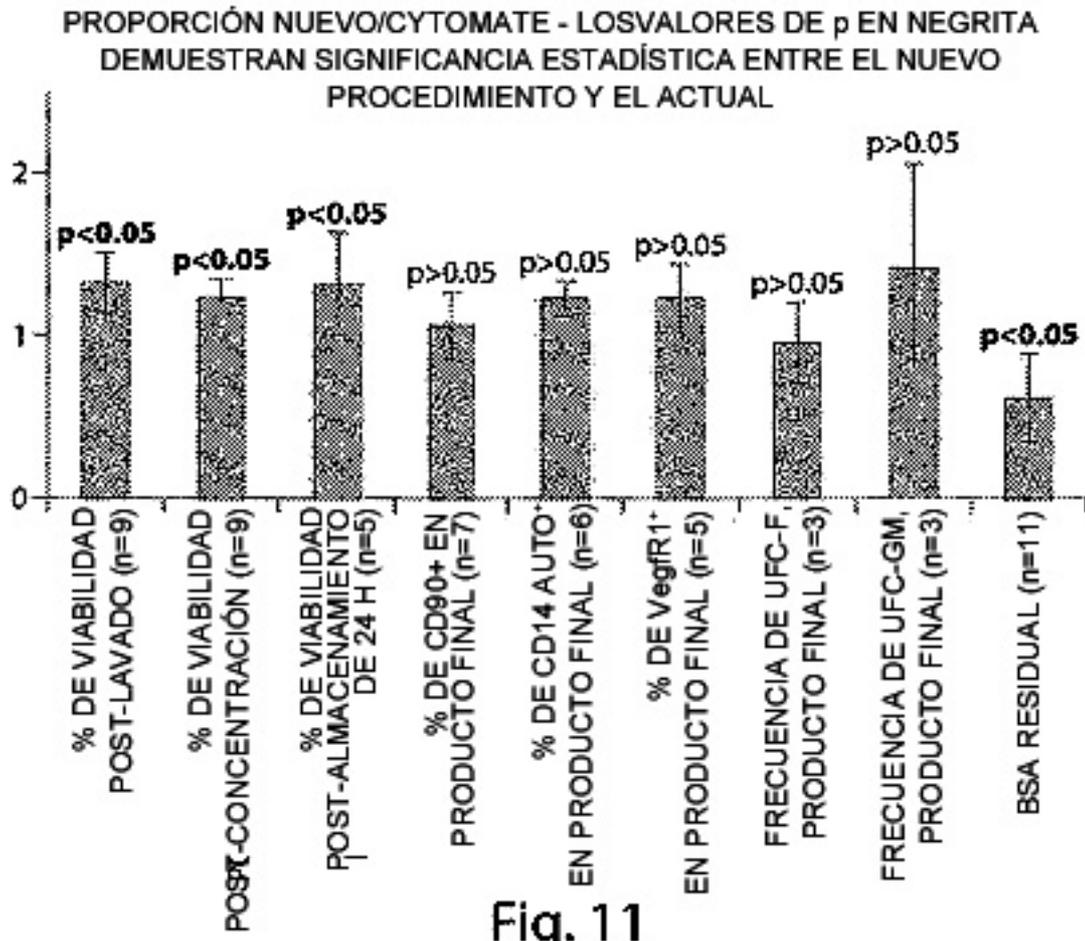


Fig. 10B



PROPORCIÓN NUEVO/CYTOMATE - LOS VALORES DE  $p$  EN NEGRITA MUESTRAN SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA ENTRE EL NUEVO PROCEDIMIENTO Y EL ACTUAL

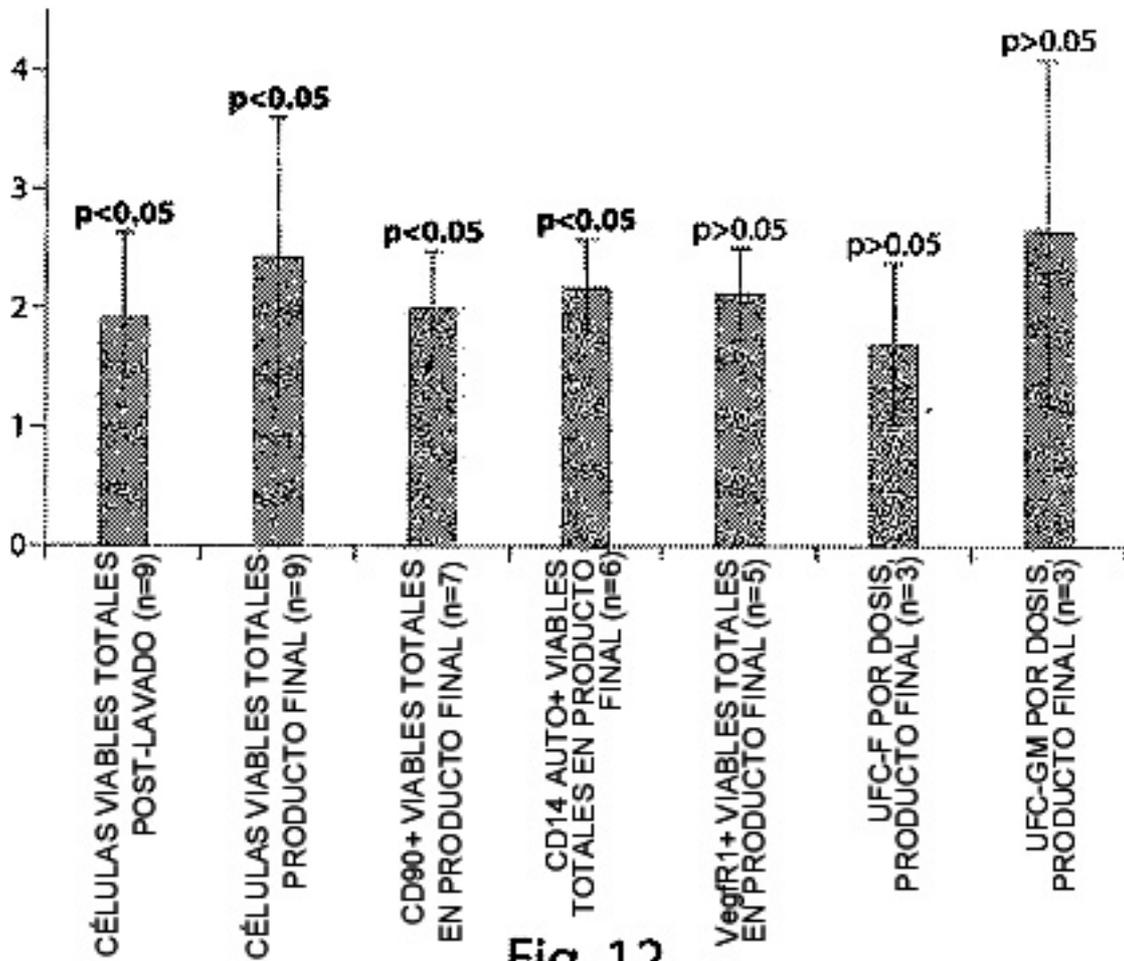


Fig. 12

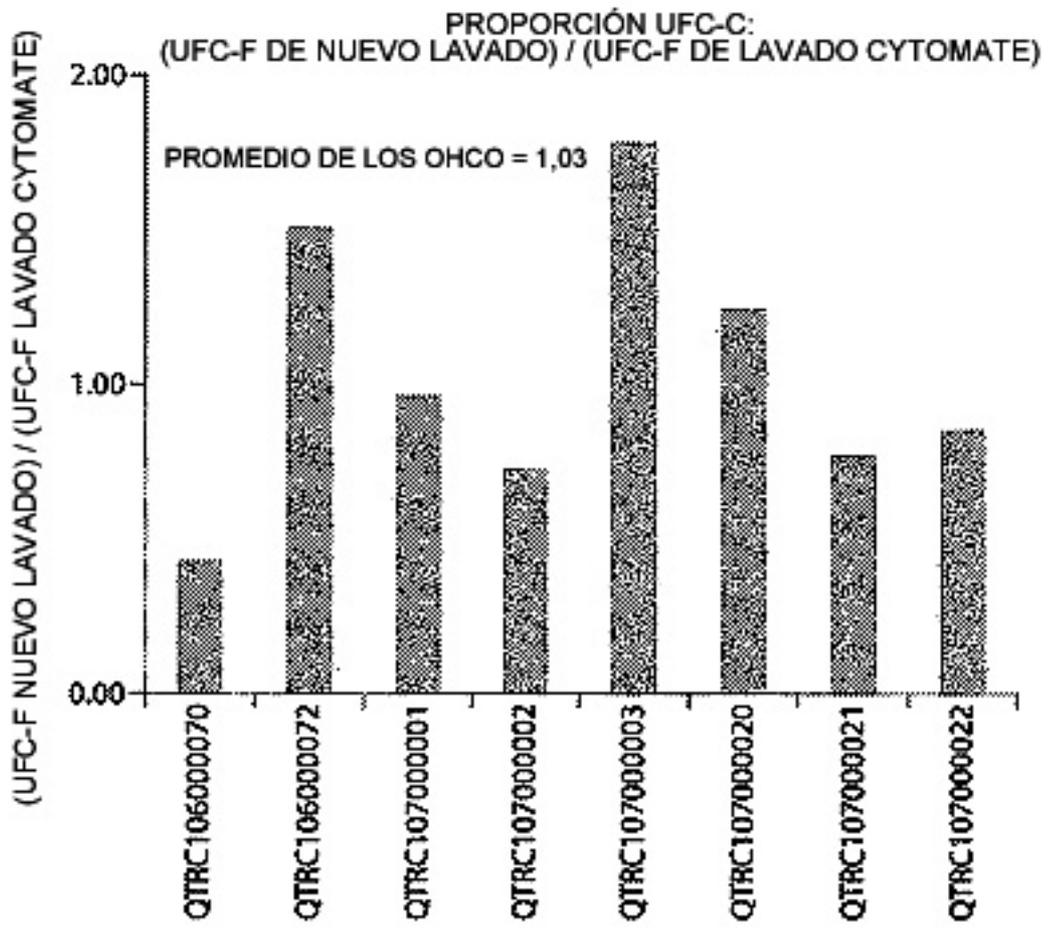
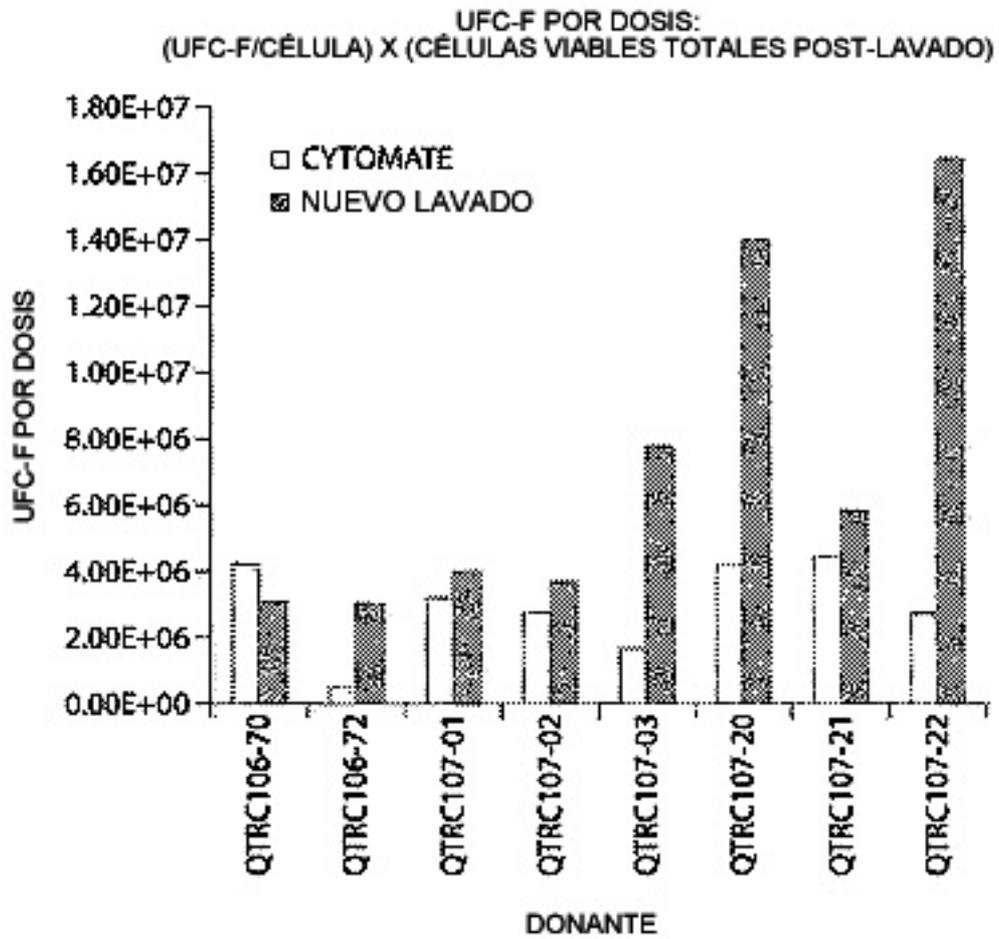


Fig. 13



DONANTE  
Fig. 14

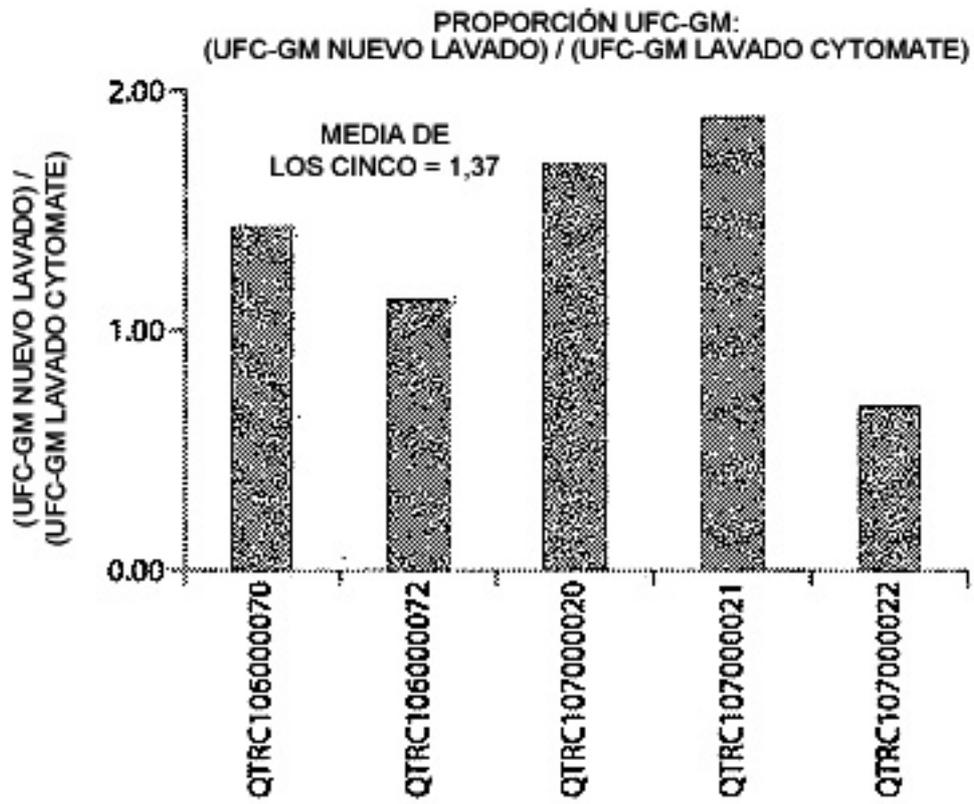
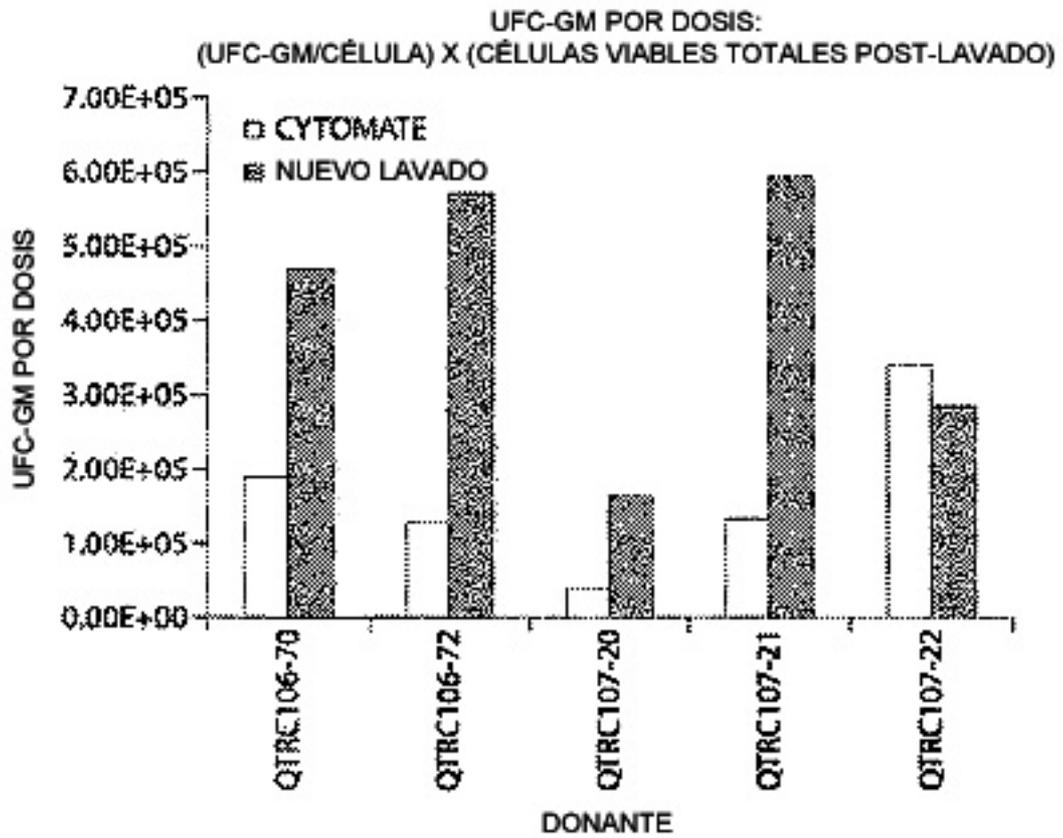


Fig. 15



DONANTE  
**Fig. 16**

PRODUCTO DEL NUEVO LAVADO  
ADMINISTRACIÓN DE CRT MEDIANTE AGUJA TRAS ALMACENAMIENTO  
DE 24 H A 4°C  
VIABILIDAD SEGÚN NUCLEOCOUNTER

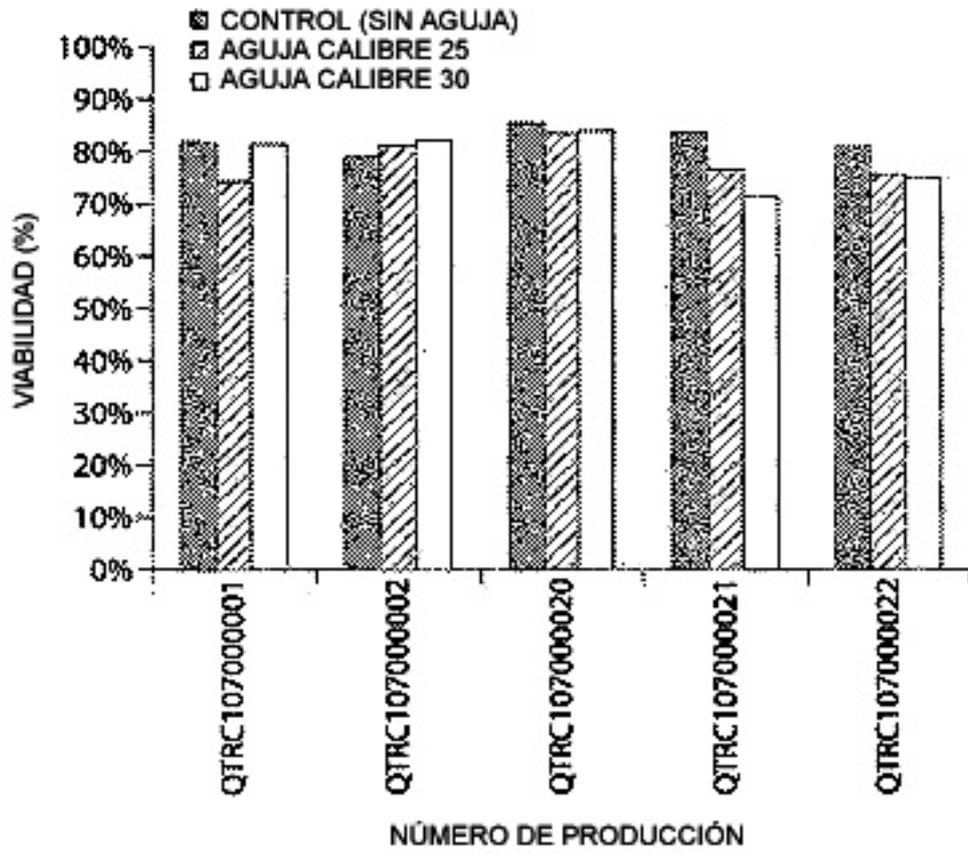


Fig. 17

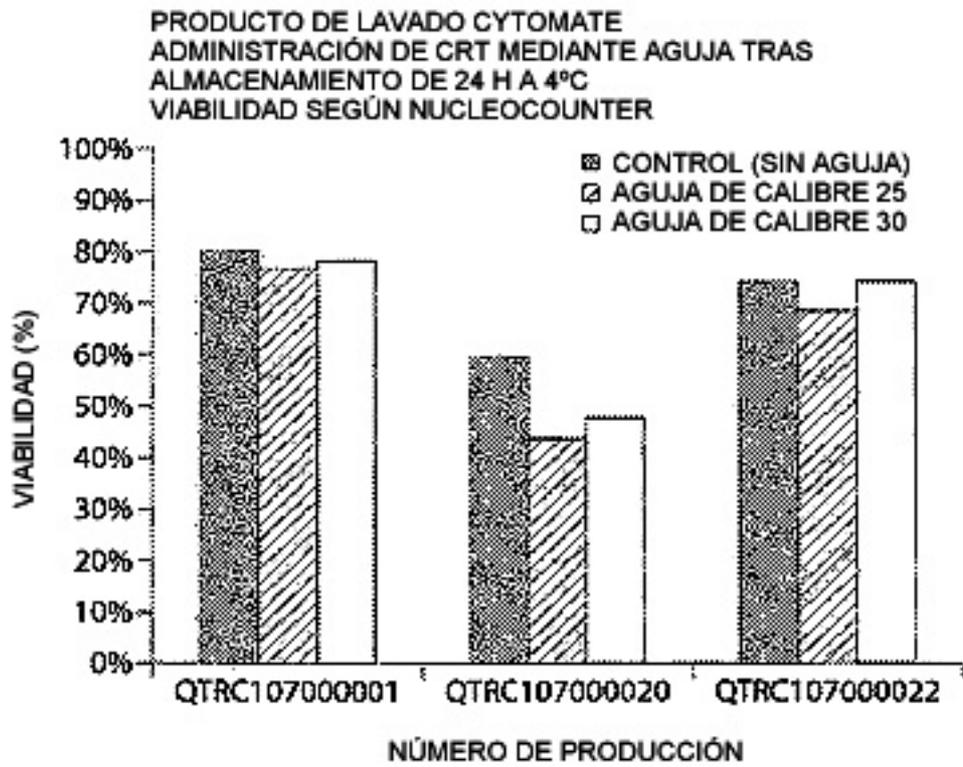


Fig. 18

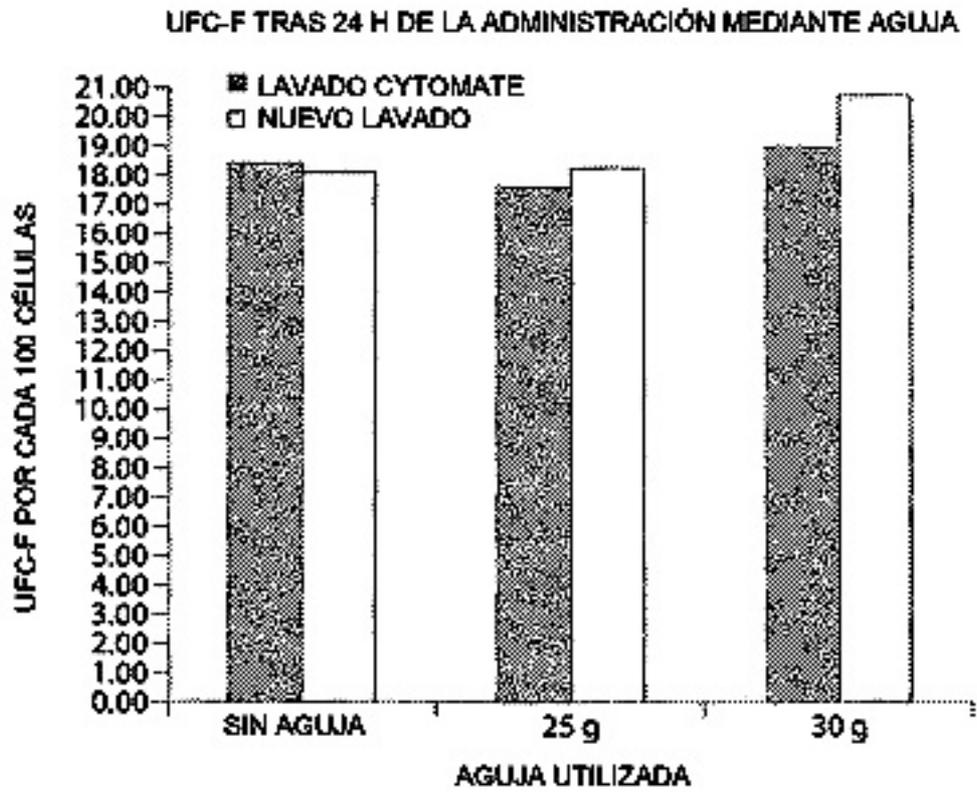


Fig. 19

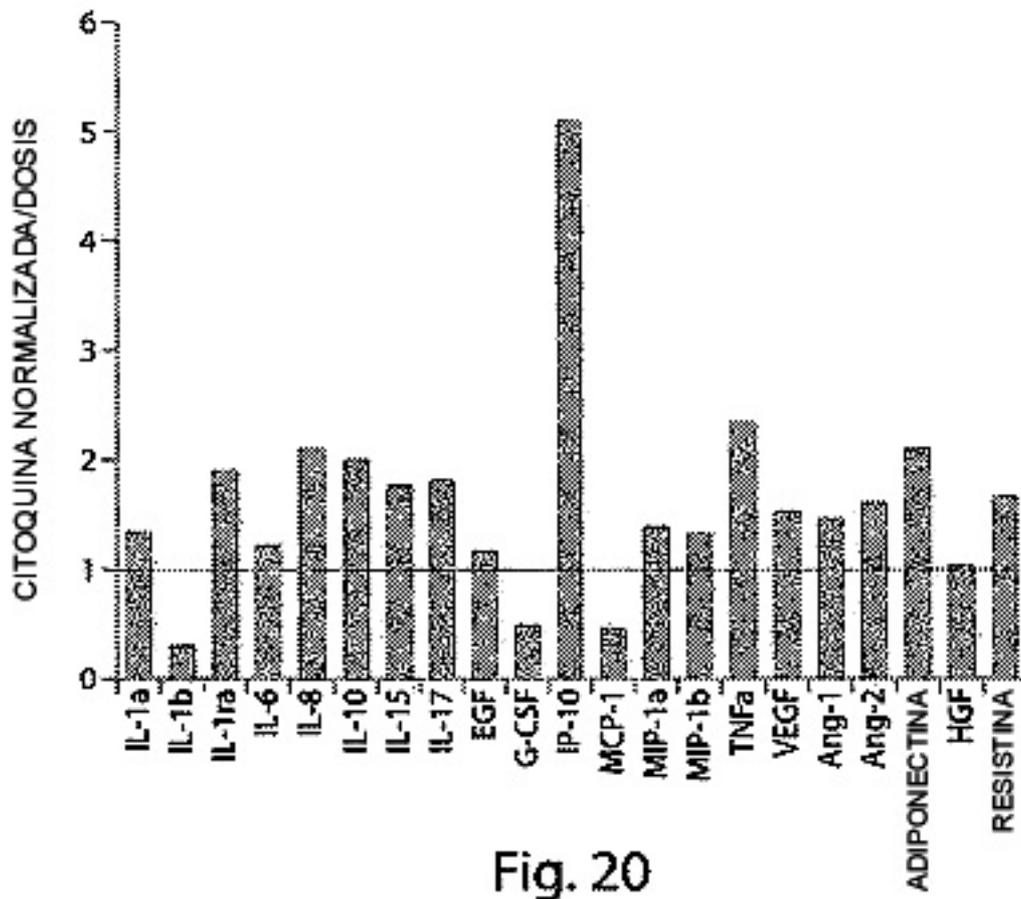


Fig. 20

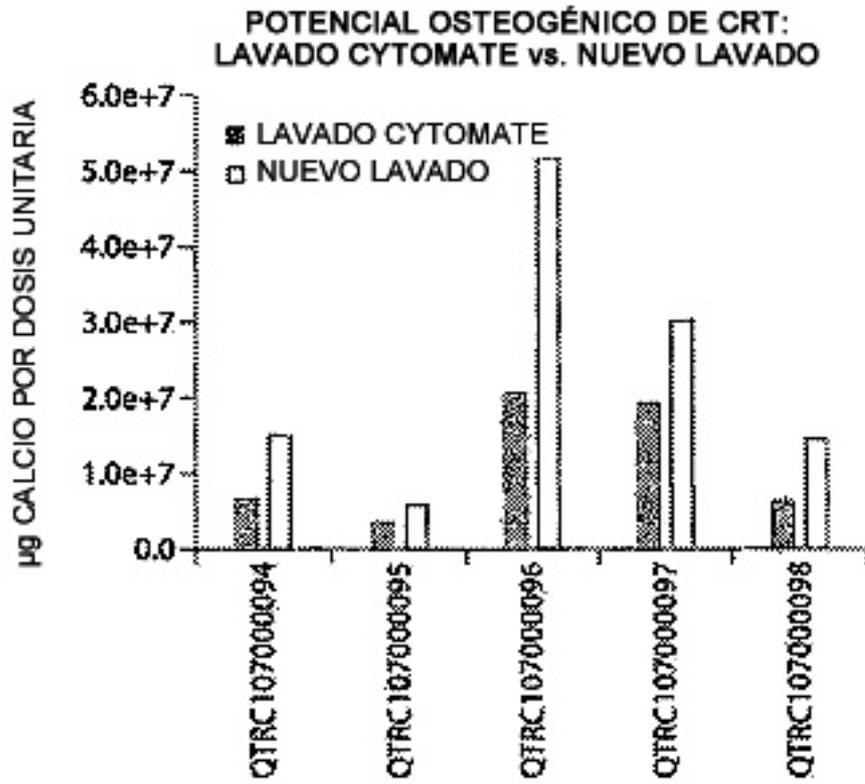


Fig. 21

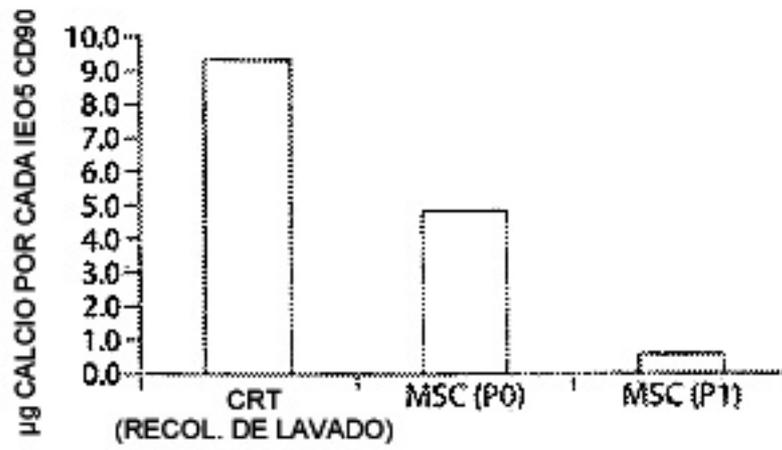


Fig. 22A

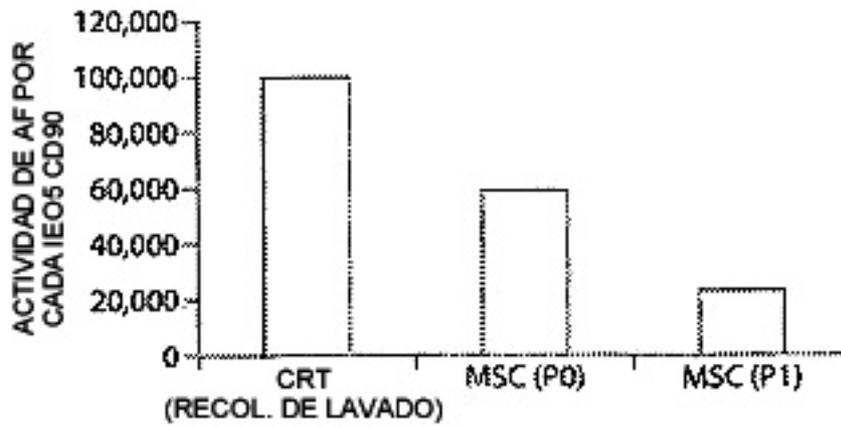


Fig. 22B

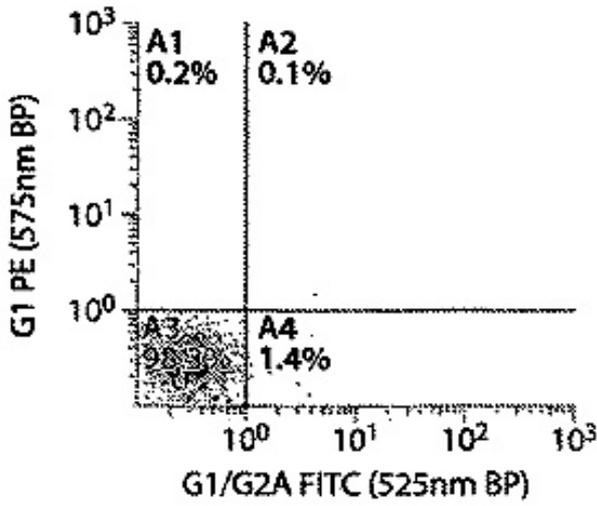


Fig. 23A

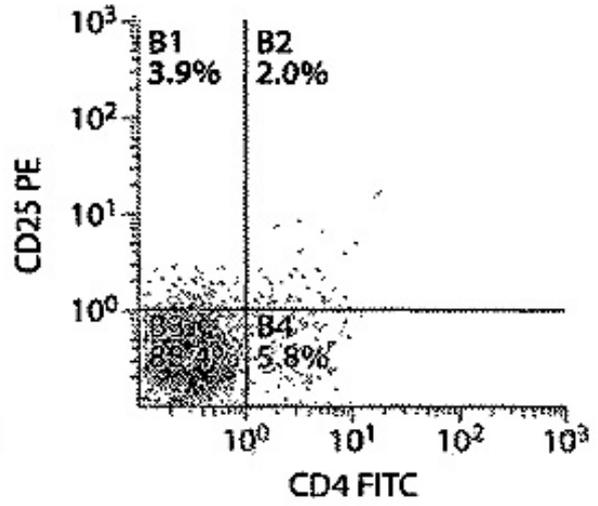


Fig. 23B

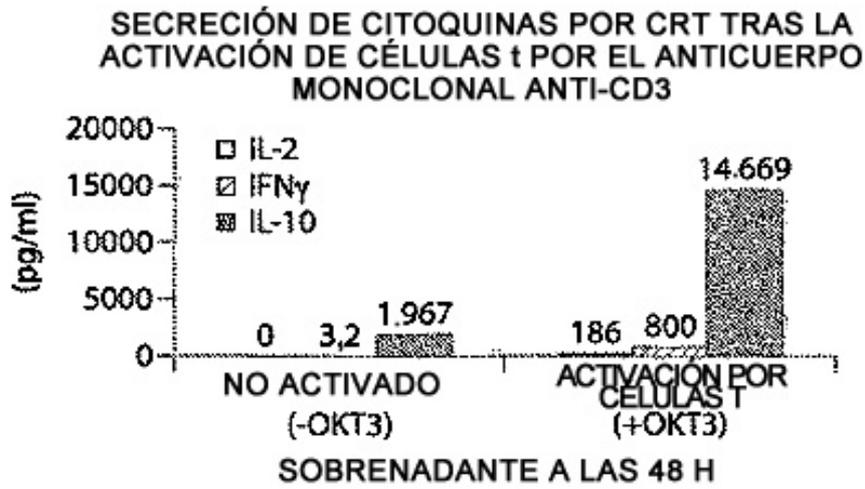


Fig. 23C

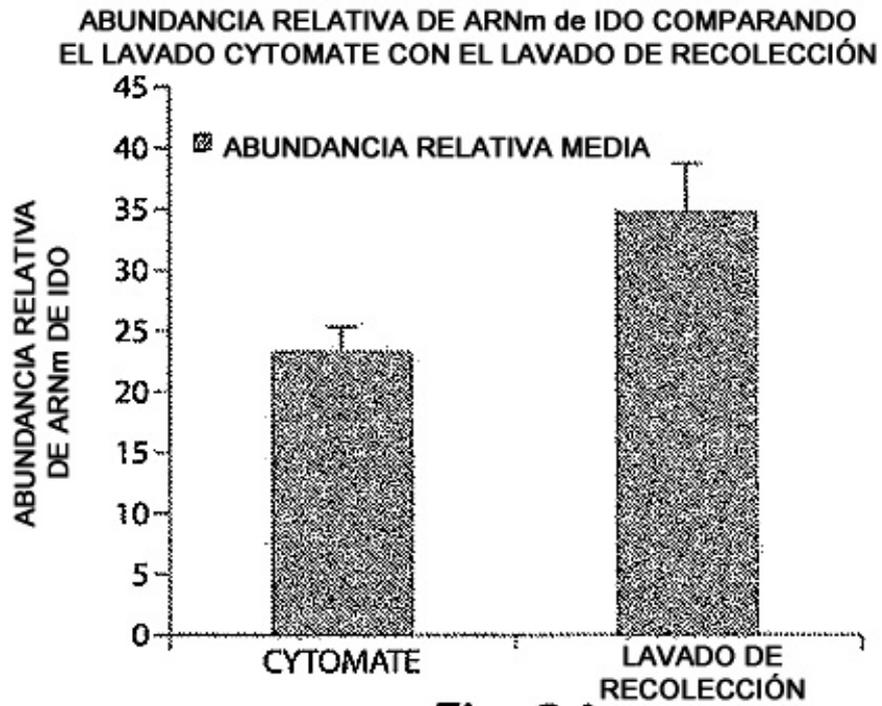


Fig. 24

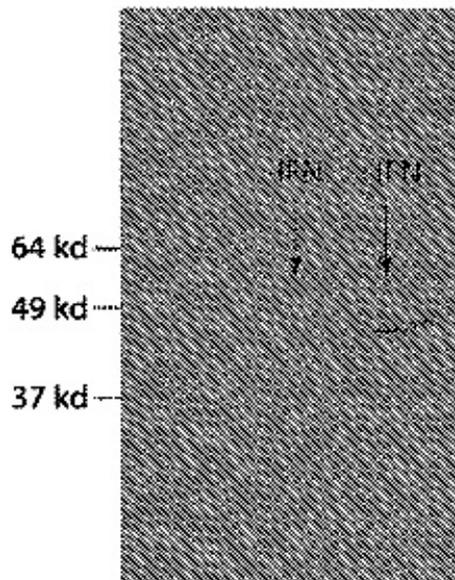


Fig. 25

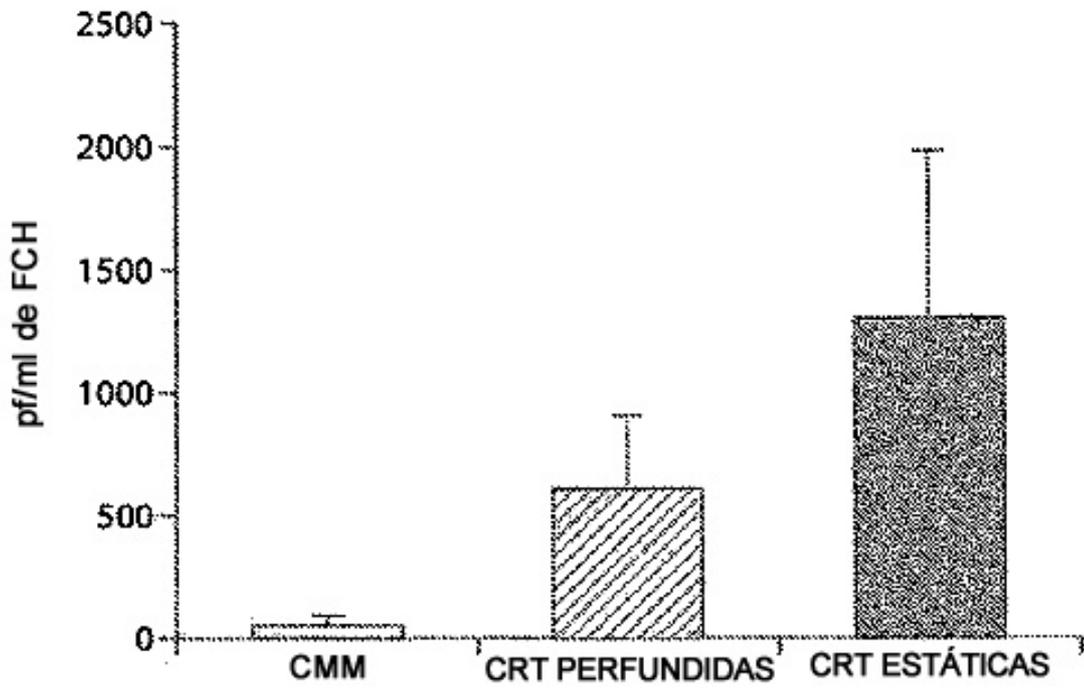


Fig. 26

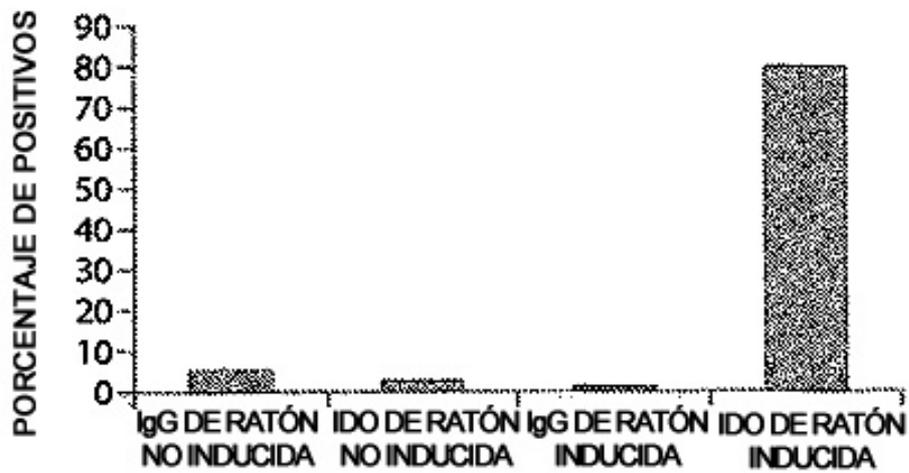
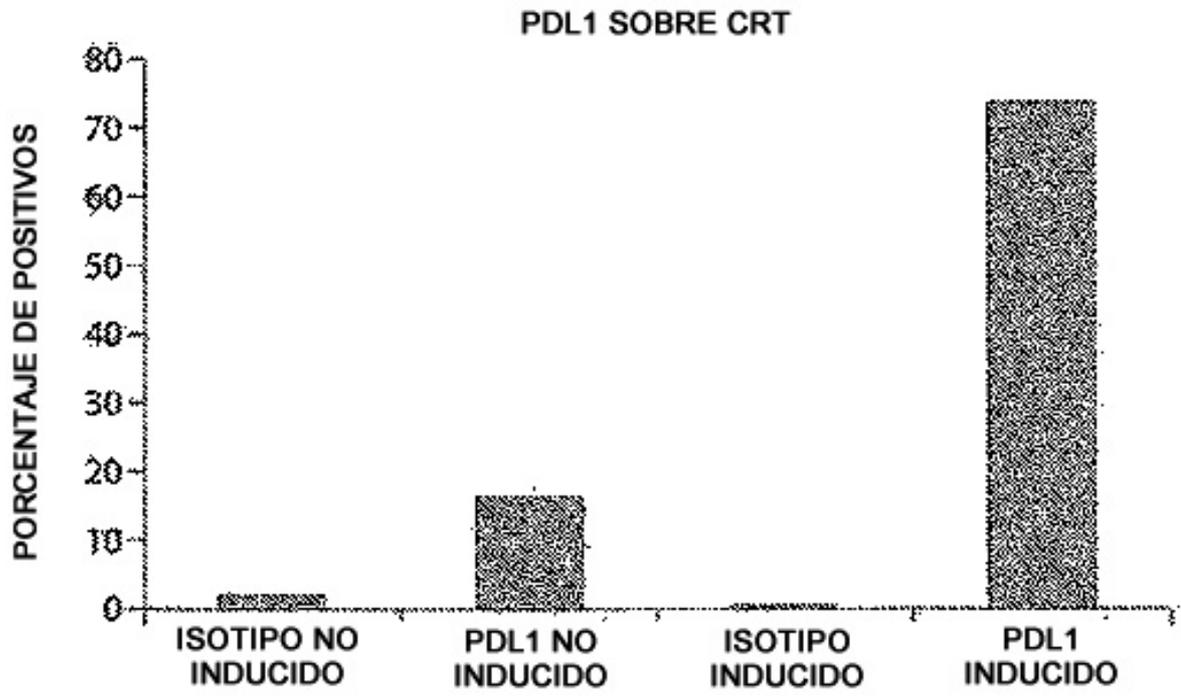


Fig. 27



**Fig. 28**

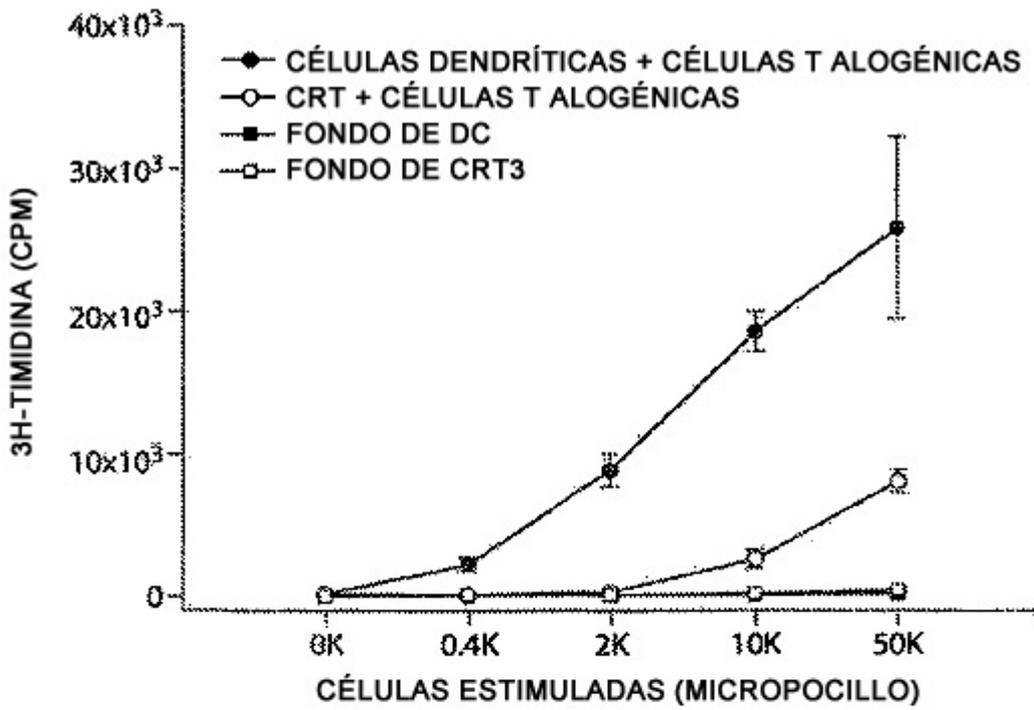


Fig. 29A

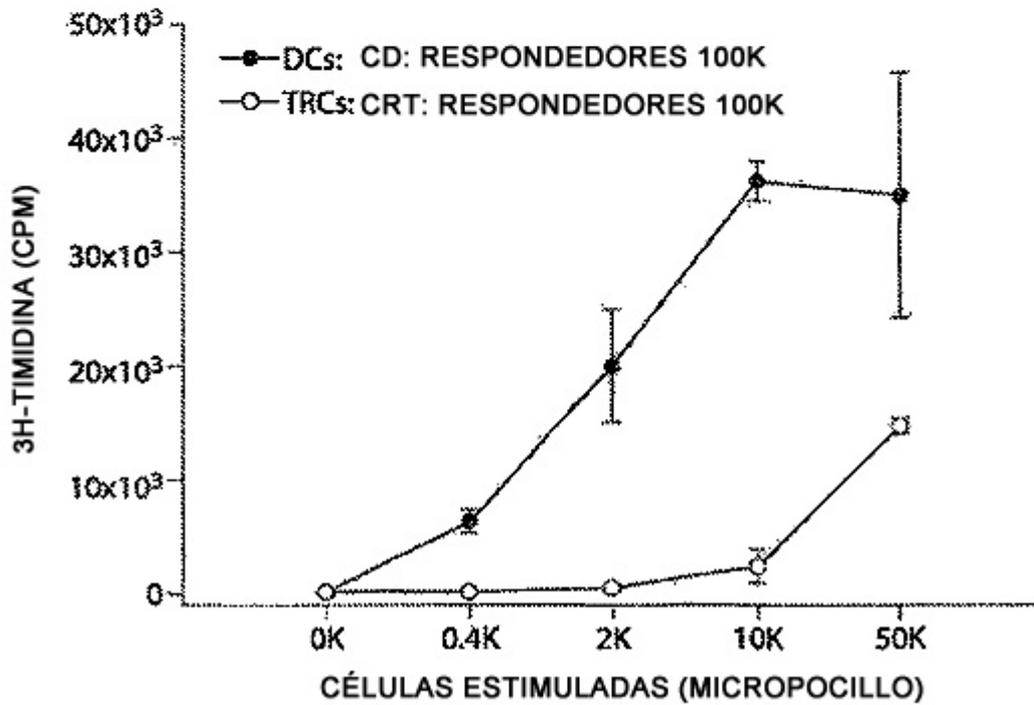


Fig. 29B

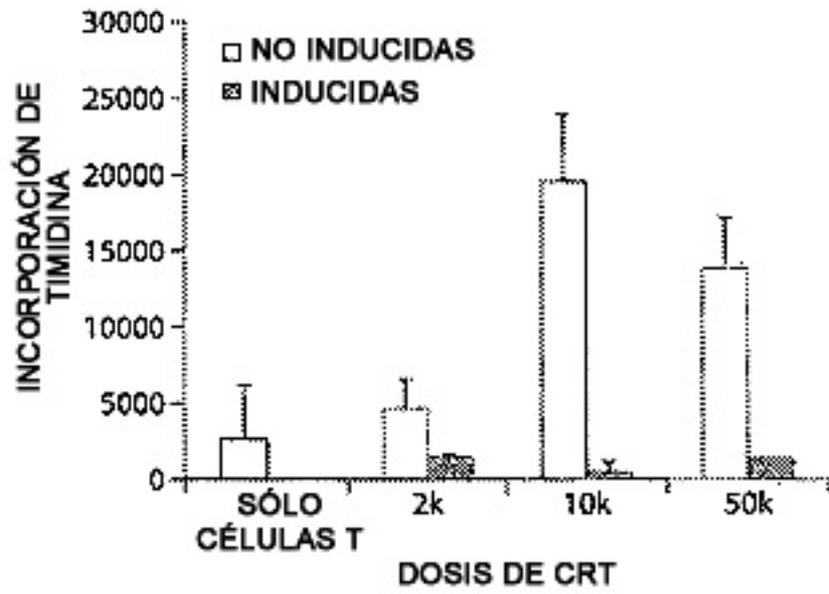


Fig. 30

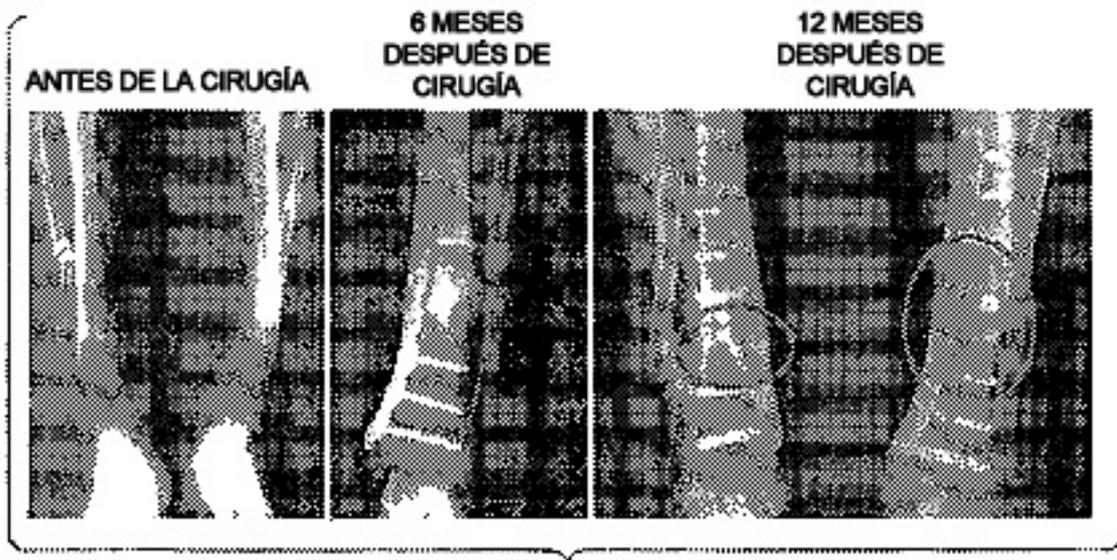
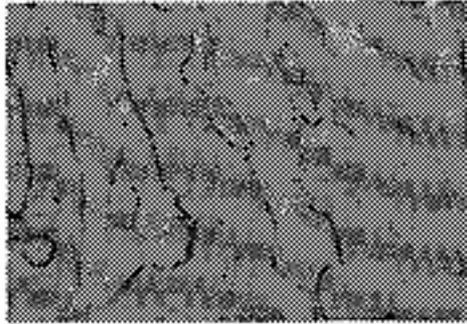
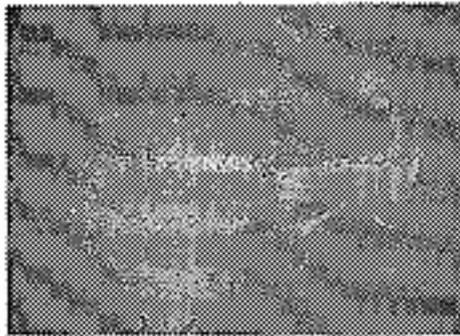


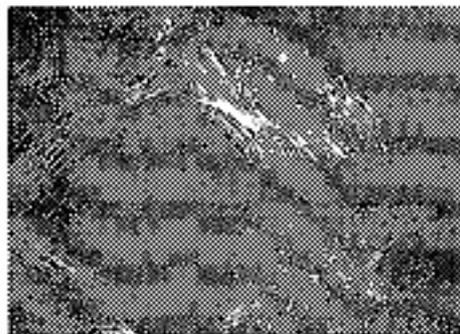
Fig. 31



**Fig. 32A**



**Fig. 32B**



**Fig. 32C**

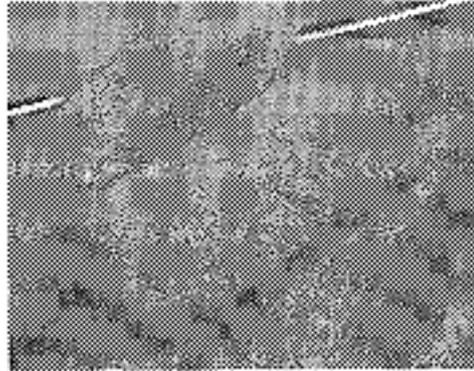


Fig. 33A

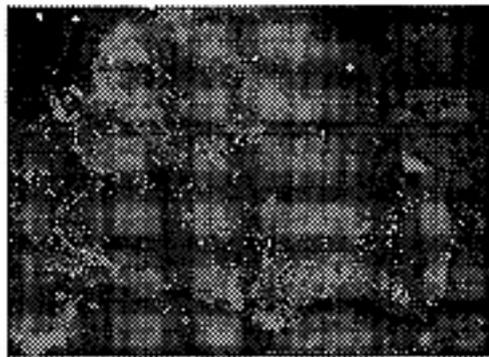
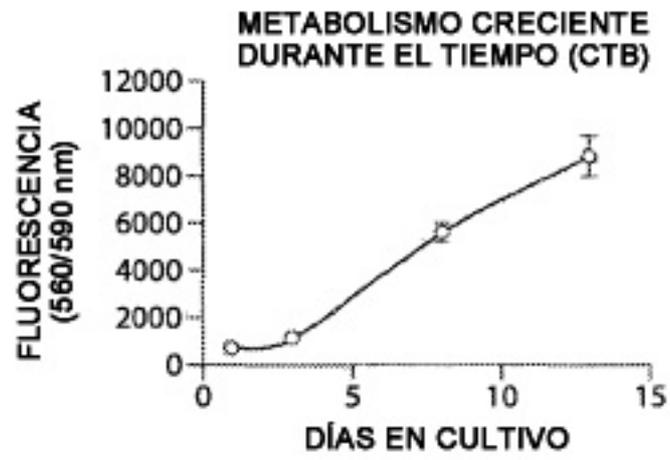


Fig. 33B



**Fig. 34A**



**Fig. 34B**

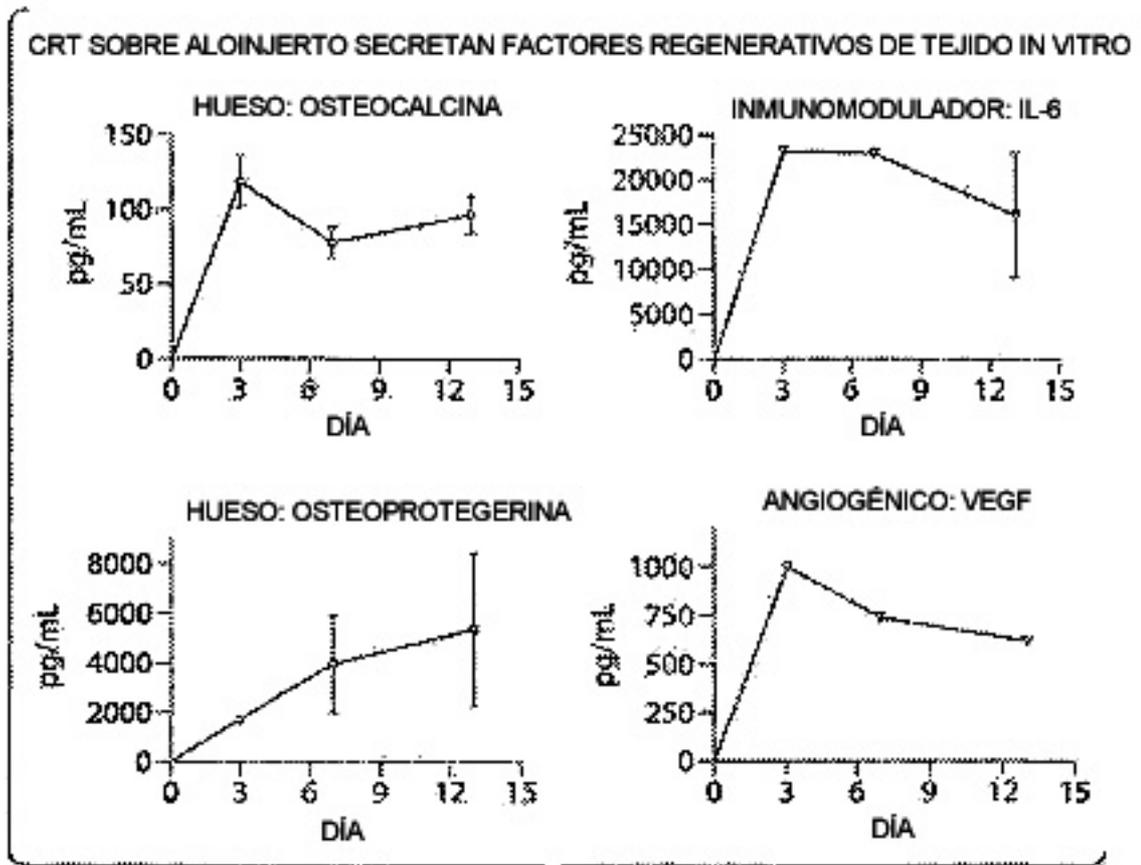


Fig. 35

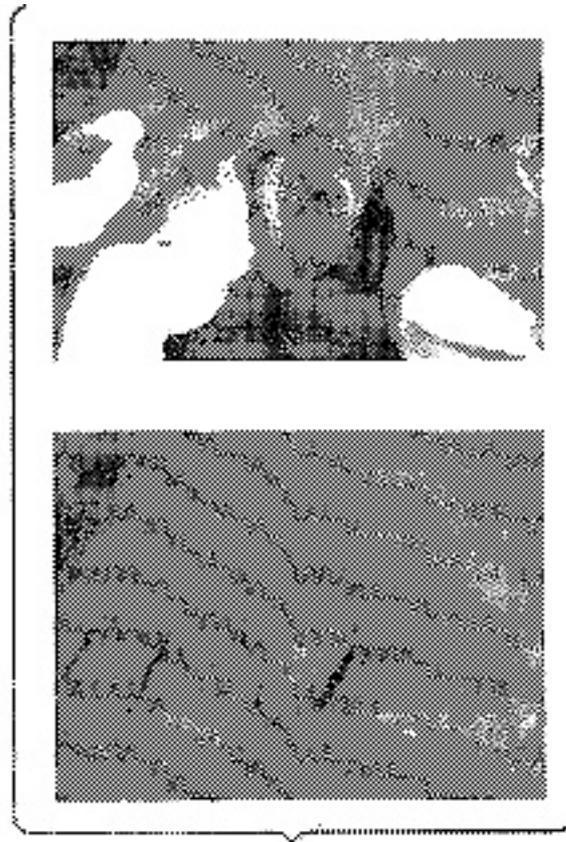


Fig. 36

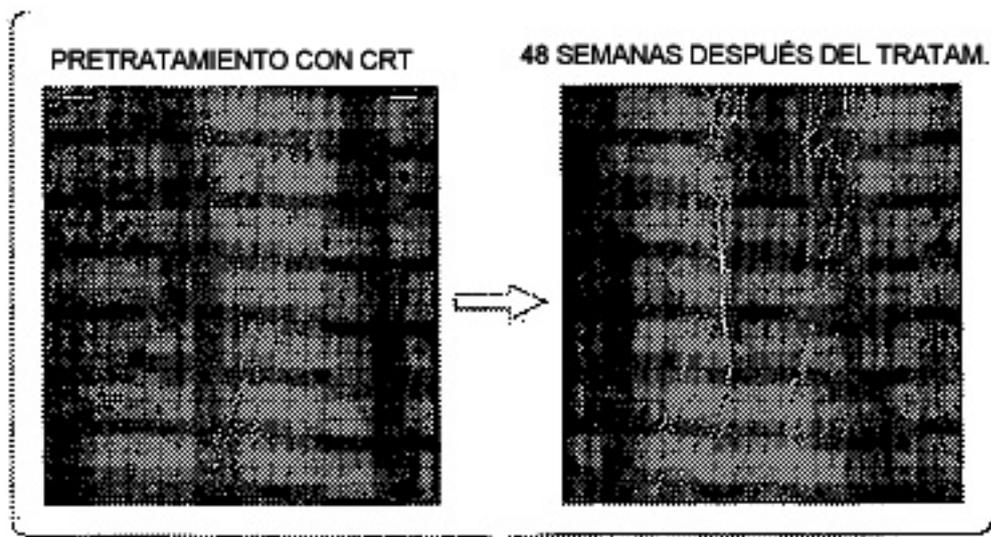


Fig. 37

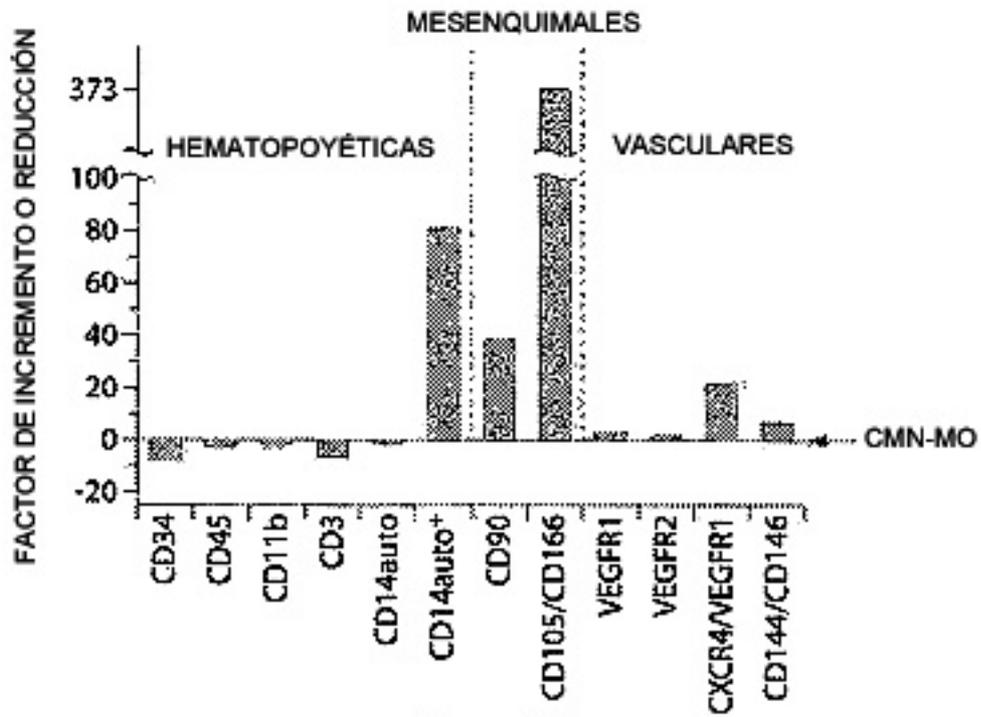


Fig. 38

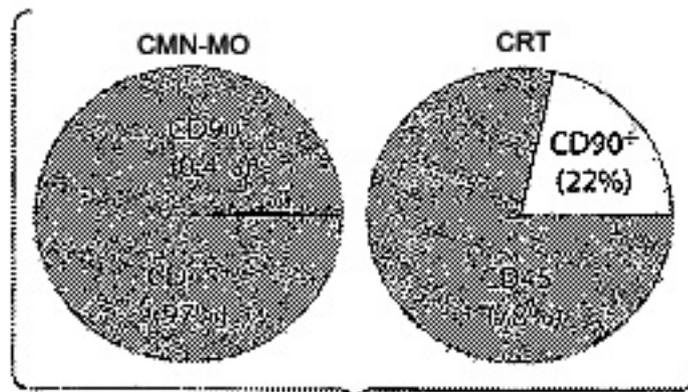
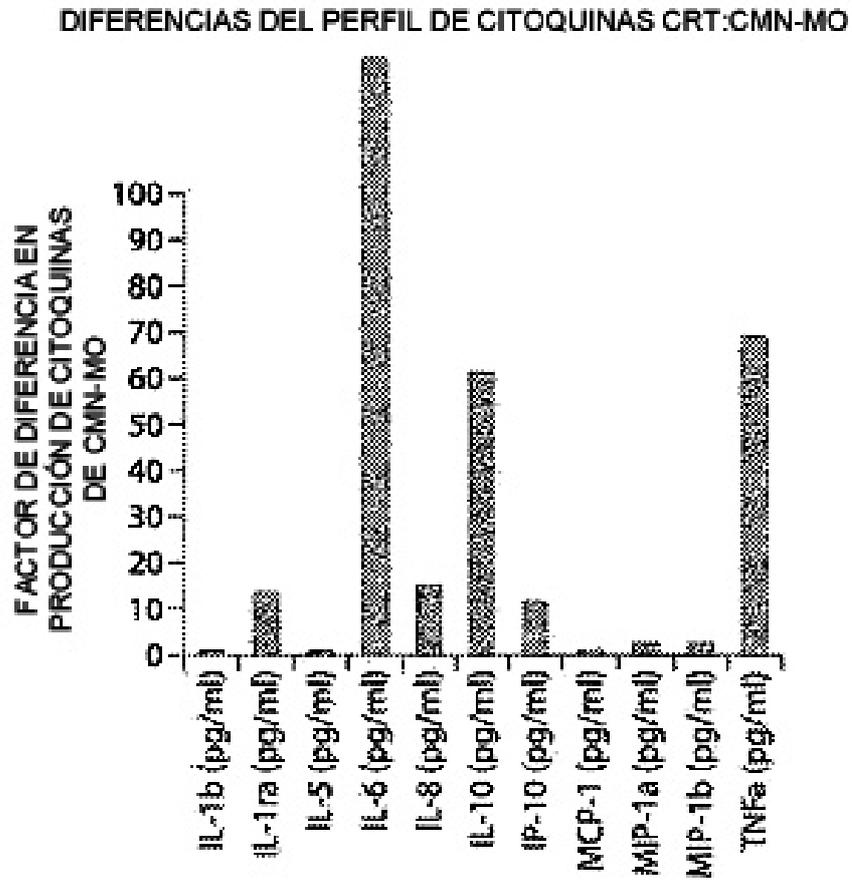


Fig. 39



**Fig. 40**

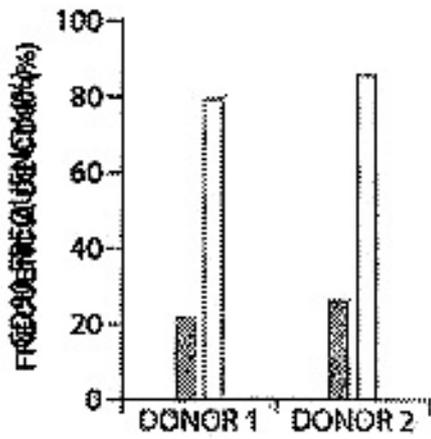


Fig. 41A

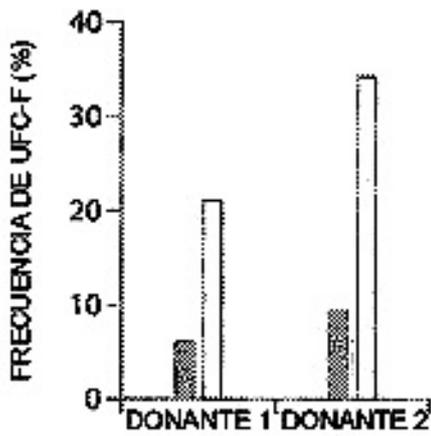


Fig. 41B

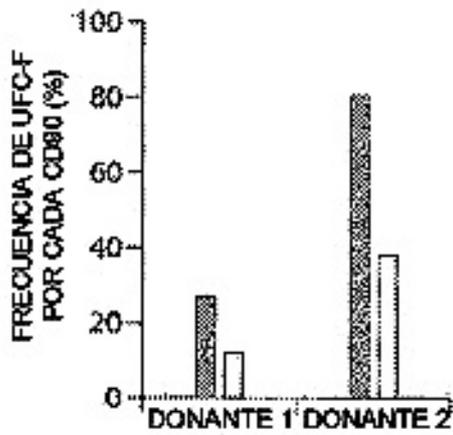


Fig. 41C

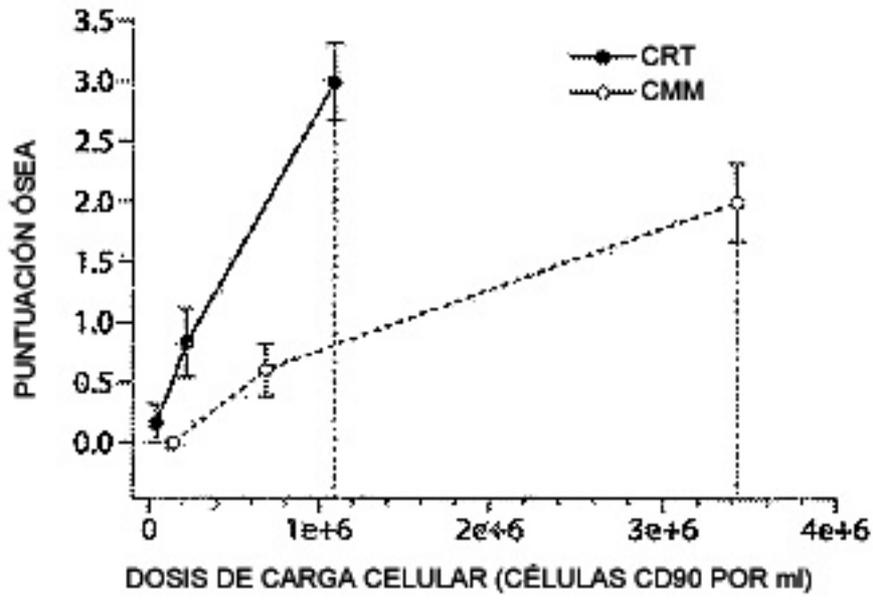


Fig. 42