

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 621**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009 E 09844076 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2425844**

54 Título: **Composición de células madre estromales derivadas de tejido adiposo autólogo y alogénico destinada al tratamiento de fístulas**

30 Prioridad:

**28.04.2009 KR 20090036942**

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

**24.07.2014**

73 Titular/es:

**ANTEROGEN CO., LTD. (100.0%)  
405 Namsung Plaza 345-30 Gasan-dong  
Geumcheon-gu, Seoul 153-802, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SUNG-KOO y  
KIM, MI-HYUNG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 479 621 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición de células madre estromales derivadas de tejido adiposo autólogo y alogénico destinada al tratamiento de fístulas

5 Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un método para la producción de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano en cantidades clínicamente eficaces con el fin de tratar fístulas, así como una composición producida por las mismas, en el que las células madre estromales pueden obtenerse de tejidos adiposos autólogos y alogénicos.

Antecedentes de la técnica

15 La medicina regenerativa se refiere a un método para el tratamiento de tejidos y/o órganos con lesiones o una función deteriorada, y se refiere de manera general a una terapia celular que utiliza células madre multipotentes. Las células madre derivadas de la médula ósea, uno de los tipos principales de células madre adultas utilizadas en la medicina regenerativa, pueden proliferar *in vitro* y diferenciarse en una diversidad de células, incluyendo, por ejemplo, miocitos, cardiocitos, osteocitos, condrocitos, adipocitos, células nerviosas, etc. Además, las células madre  
20 derivadas de la médula ósea presentan una actividad inmunomoduladora, pudiendo aplicarse de esta manera al trasplante de médula ósea alogénica o utilizarse como agentes inmunosupresores para enfermedades autoinmunitarias.

25 Debido a que el tejido adiposo contiene además una gran cantidad de células madre, recientemente se han realizado estudios en profundidad sobre la utilización de células madre adiposas como material de trasplante. El tejido adiposo presenta una cantidad considerablemente grande células madre en comparación con otros tipos de tejido (es decir, se aíslan aproximadamente 1.000 veces más células madre a partir de tejido adiposo que de la misma cantidad de médula ósea) y las células madre derivadas de tejido adiposo son multipotentes al igual que las células madre derivadas de la médula ósea, con capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteocitos, adipocitos, miocitos y similares. Además, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo muestran una expresión similar de marcadores de superficie celular a la de las células madre derivadas de médula ósea y presentan actividades inmunomoduladoras *in vivo* e *in vitro* de la respuesta inmunológica autóloga o alogénica.  
30

35 Las fístulas son canales generados anormalmente en el cuerpo y pueden generarse en diversos sitios del cuerpo por diferentes causas. Las fístulas de aparición más frecuente en general se encuentran presentes en el sistema intestinal, incluyendo el ano y el recto. Las fístulas anales están causadas frecuentemente por un trastorno inflamatorio en el que se inflama la glándula anal, la inflamación se extiende al exterior de la piel y exuda una descarga tal como pus y explica aproximadamente 20% de los hemorroides anales.

40 La fístula anal se refiere sustancialmente a un canal anormal entre el canal rectal y una piel perianal, e induce una descarga fecal anormal por un sitio abierto y no por el ano. Ello se debe con mayor frecuencia a la aparición de abscesos anorrectales, que, a su vez, forman fístulas que descargan pus. Dicha fístula formada se denomina 'fístula-en-ano'. Es decir, la fístula-en-ano es un orificio alargado formado a partir del recto o del interior del canal anal que se prolonga hasta una piel perianal al estallar el absceso anorrectal. La fístula-en-ano puede clasificarse en los  
45 cuatro tipos siguientes según la importancia de la función del esfínter anal externo en el funcionamiento anal:

- (1) una fístula-en-ano de tipo inter-esfintérico que presenta un tracto de la fístula formado entre el esfínter anal interno y el esfínter anal externo,
- 50 (2) una fístula-en-ano de tipo trans-esfintérico que presenta un tracto de la fístula formado que penetra a través del esfínter anal externo,
- (3) una fístula-en-ano de tipo supra-esfintérico que presenta un tracto de la fístula formado en la parte superior del esfínter anal externo,
- (4) una fístula-en-ano de tipo extra-esfintérico que presenta una fístula primaria formada en una posición próxima al recto en la parte superior de una cripta anal y no en la cripta anal misma.

55 Es generalmente conocido que la causa principal de la fístula-en-ano es la infección de las glándulas perianales y, además, la fístula-en-ano en ocasiones se produce debido a tuberculosis, enfermedad de Crohn, cáncer, leucemia, leucopenia o similar. La enfermedad de Crohn se caracteriza por la inflamación crónica y recurrente del intestino y se considera una enfermedad rara. Entre las fístulas causadas por la enfermedad de Crohn pueden incluirse, por ejemplo, las fístulas recto-vaginales conectadas a la vagina; las fístulas entéricas formadas en una posición próxima a los intestinos, etc., así como la fístula-en-ano.  
60

La mayoría de fístulas se remedian mediante una operación quirúrgica. El objetivo principal del tratamiento de las fístulas en el recto perianal es tratar por completo la enfermedad, conservando simultáneamente la función normal de los esfínteres anales. Sin embargo, con frecuencia las fístulas son recurrentes, incluso tras una operación  
65

quirúrgica, y pueden causar, por ejemplo, incontinencia fecal debido a trastornos de la función anal, etc. Por lo tanto, los métodos quirúrgicos actuales no proporcionan efectos del tratamiento satisfactorios.

Entre las operaciones de fístula pueden incluirse, por ejemplo, la fistulotomía, setón, utilización de colgajo desplazado, un procedimiento de relleno muscular, la utilización de cola de fibrina, o similares. Entre ellas, la cola de fibrina ha sido utilizada como sellante quirúrgico en cirugía general mediante la mezcla de fibrinógeno y trombina para formar un coágulo de fibrina. Para la fístula-en-ano, se inyecta la cola de fibrina a través de una abertura externa en un tracto de fístula, de manera que se rellena el tracto de la fístula, así como una abertura interna de la fístula-en-ano.

En los últimos años, debido a que se llevan a cabo estudios en profundidad relacionados con las células madre, se ha llevado a cabo un método de tratamiento de la fístula-en-ano mediante el trasplante de células madre en un sitio de fístula. Por ejemplo, Mizuno *et al.* (Plast. Reconstr. Surg. 109:199-209, 2002) han demostrado que las células madre adultas aisladas a partir de tejido adiposo pueden diferenciarse en células musculares, mientras que Damian *et al.* (Dis Colon Rectum 48:1416-1423, 2005) han demostrado que las células madre adiposas pueden utilizarse con seguridad para tratar fístulas-en-ano de pacientes que sufren de enfermedad de Crohn en ensayos clínicos de fase I. Además, se ha informado de que, al someter pacientes con enfermedad de Crohn a trasplante de células madre adultas para tratar una fístula rectal, no se produce incontinencia fecal ni siquiera transcurridos 3 meses del trasplante.

Es conocido que resulta sencillo implementar el cultivo *in vitro* de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo. Sin embargo, con el fin de obtener un número clínicamente eficaz de células, generalmente se requiere una cantidad relativamente grande de tejido adiposo y un periodo de cultivo prolongado. Concretamente, el tratamiento de fístulas en pacientes que sufren de enfermedades crónicas y/o recurrentes, tales como la enfermedad de Crohn, requiere una cantidad masiva de células, así como un procedimiento de cultivo celular mejorado. Además, en el caso de que se autorice la utilización de células estromales derivadas de tejido adiposo alogénico, podrían resultar clínicamente muy útiles.

El documento nº WO 2006/136244 (28 de diciembre de 2006) da a conocer el tratamiento de las fístulas con células madre estromales derivadas de tejido adiposo y el uso de las mismas. Sin embargo, debido a que las células madre adiposas utilizadas en el tratamiento se obtienen del paciente mismo, en el caso de que éste no presente suficiente tejido adiposo, el número de células madre contenidas en el tejido adiposo sea considerablemente reducido, o no se consiga cultivar células madre autólogas, podría no conseguirse un tratamiento clínicamente adecuado. Especialmente en el caso de pacientes con fístula de Crohn, se observa una inflamación entérica significativa, que induce pérdida de peso y un bajo índice de masa corporal del paciente. Para este tipo de pacientes, resulta difícil garantizar una cantidad suficiente de células madre estromales derivadas de tejido adiposo. Además, debido a que la enfermedad continúa durante un periodo de tiempo prolongada y empeora habitualmente provocando la aparición de varias fístulas en el mismo paciente y se incrementa relativamente el tamaño de la fístula, resulta necesaria una cantidad masiva de células madre para el tratamiento del paciente.

Por otra parte, para el cultivo *in vitro* de células estromales derivadas de tejido adiposo, en el caso de que se utilicen métodos de cultivo celular estándares dados a conocer en patentes existentes (documento nº WO 2007/011797, patente nº US 6.777.231, etc.) o en documentos publicados (Tissue Engineering 7(2):211-228, 2001, etc.), el cultivo de células *in vitro* requiere mucho tiempo, por lo que resulta difícil obtener un número clínicamente eficaz de células. Por consiguiente, podría deteriorarse la eficiencia real en las aplicaciones clínicas. Aunque todavía se desconocen los fundamentos exactos, la velocidad de proliferación de las células madre de tejido adiposo varía en diferentes individuos y el cultivo celular puede fracasar debido a que las células madre de tejido adiposo no proliferan activamente durante el cultivo *in vitro*. Además, las funciones biológicas de las células madre adiposas, incluyendo, por ejemplo, la multipotencia, la actividad inmunomoduladora o similar, pueden variar según los donantes de las mismas. Por lo tanto, la utilización de las células madre de tejido adiposo alogénico con características clínicamente eficaces podría mejorar la eficacia del tratamiento de las fístulas.

#### Problema técnico

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a la utilización de células madre estromales aisladas a partir de tejidos adiposos humanos en el tratamiento de las fístulas, y el objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado para producir un número clínicamente eficaz de células madre estromales, así como una composición de células madre de tejido adiposo producidas mediante el método anteriormente indicado.

#### Solución técnica

Con el fin de alcanzar el objetivo anteriormente indicado, la presente invención proporciona una composición de células madre de tejido adiposo para el tratamiento de fístulas, que comprende células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénico.

Con el fin de alcanzar otro objetivo indicado anteriormente, la presente invención proporciona un método para la producción de una composición de células madre de tejido adiposo que comprende células madre estromales derivadas de tejido adiposo, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) aislar una fracción vascular estromal ('FVE') a partir del tejido adiposo recogido de un sujeto,
- (b) incubar la FVE en un medio estromal,
- (c) incubar la FVE en un medio de expansión que contiene EGF o bFGF como factor de crecimiento, con el fin de cultivar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo, y
- 10 (d) cultivar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo durante como mínimo un pase.

Según la presente invención, se proporciona además una composición de células madre del tejido adiposo producidas mediante el método anteriormente proporcionado, que pueden utilizarse para el tratamiento de una fístula, que comprende la etapa de administrar la composición anteriormente indicada en una fístula de un paciente.

15 La presente invención se refiere sustancialmente a un método para la producción de cantidades clínicamente eficaces de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano con el fin de tratar las fístulas, y una composición producida por las mismas. Las células estromales derivadas de tejido adiposo utilizadas en el trasplante pueden aislarse a partir de tejido adiposo autólogo y/o alogénico. Más particularmente, las células estromales derivadas de tejido adiposo alogénico según la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento sin aislar tejido adiposo de un paciente sujeto y pueden seleccionarse células madre de tejido adiposo alogénico que presentan una eficacia de tratamiento más excelente y utilizarse en el tratamiento, presentando de esta manera idoneidad clínica.

25 Además, con respecto al cultivo de una fracción vascular estromal (en lo sucesivo denominada con frecuencia 'FVE') aislada a partir de tejido adiposo autólogo o alogénico, la presente invención puede utilizarse apropiadamente un medio estromal y un medio de expansión para implementar el cultivo, produciendo eficazmente de esta manera un número clínicamente eficaz de células madre estromales en un tiempo corto. Más particularmente, la presente invención puede utilizarse un medio de expansión que incluye factores de crecimiento específicos, tales como un factor de crecimiento fibroblástico básico (en lo sucesivo denominado 'bFGF') o un factor de crecimiento epidérmico (en lo sucesivo denominado 'EGF'), para reducir observablemente de esta manera el tiempo de cultivo de las células madre y controlar fácilmente la tasa de crecimiento de las mismas, lo que varía en diferentes individuos. Además, las células madre del tejido adiposo producidas mediante el método de la invención muestran una velocidad de diferenciación y actividad inmunomoduladora superiores en comparación con las producidas mediante los métodos de cultivo celular existentes.

35 En el caso de que se proporcione un tejido adiposo abundante aislado de un paciente mediante liposucción, podrán purificarse y utilizarse células madre derivadas del tejido adiposo. Sin embargo, en la mayoría de casos, con el fin de obtener una cantidad suficiente de células madre derivadas de tejido adiposo para el trasplante, resulta necesaria una etapa de proliferación. Es decir, tras calcular una cantidad del tejido adiposo obtenido mediante liposucción, el número de células madre estromales derivadas de tejido adiposo aisladas a partir de tejido adiposo y el número de células madre necesarias para el trasplante, debe llevarse a cabo el cultivo y subcultivo celulares para obtener un número clínicamente eficaz de células madre. Para el trasplante alogénico, resulta recomendable un subcultivo para eliminar suficientemente una serie de células que podrían inducir una respuesta inmunológica, tales como células inmunológicas, fibroblastos o similares, y para producir una población homogénea de las células madre estromales. Preferentemente debería llevar a cabo por lo menos un subcultivo.

45 En el presente texto, la expresión "medio estromal" se refiere a un medio para incubar la FVE y puede prepararse mediante la adición de FBS al 10% y antibióticos al 1% a un medio de cultivo celular apropiado, tal como DMEM o DMEM/F12. Por otra parte, la expresión "medio de expansión" se refiere a un medio utilizado para la proliferación de células madre derivadas de tejido adiposo y puede incluir además bFGF o EGF en el medio estromal.

50 Según un método de cultivo de la presente invención, un tiempo de duplicación medio de las células madre derivadas de tejido adiposo es aproximadamente 48 horas para conseguir de esta manera efectos notablemente incrementados en comparación con un método de cultivo convencional (documento nº WO 2007/011797) que requiere un tiempo de duplicación medio de entre aproximadamente 72 y 120 horas. Tal como se muestra en la fig. 1, el periodo de cultivo medio en cada pase es de 4 días bajo condiciones predeterminadas según la presente invención, mientras que el periodo medio para cada pase según el método convencional es de 7 días y, por lo tanto, la presente invención puede reducir considerablemente los días para la producción celular, es decir, el tiempo necesario para producir un número suficiente de células. Por ejemplo, para obtener  $1 \times 10^8$  células madre adiposas utilizando 50 ml de lipoaspirado donado, los métodos de cultivo existentes requieren por lo menos 30 días. En contraste, al incubar el lipoaspirado donado en un medio de expansión de la presente invención que incluye bFGF o EGF en un medio estromal típico, puede obtenerse un producto deseado en aproximadamente 15 días. Según otro ejemplo, en el caso de que la cantidad de lipoaspirado donado sea inferior a 50 ml, el método de cultivo existente comporta dificultades para producir un número clínicamente eficaz de células madre adiposas, mientras que la presente invención proporciona un método de cultivo mejorado para superar dichas dificultades.

5 Para el cultivo de células madre estromales, el tiempo de duplicación varía considerablemente según los donantes del tejido adiposo; sin embargo, la presente invención puede minimizar las diferentes de tiempo de cultivo debido a las diferencias individuales entre donantes. En consecuencia, un método de cultivo celular de la presente invención puede resultar adecuado para garantizar un número clínicamente eficaz de células para el tratamiento de las fístulas.

10 En general, es conocido que, a medida que se incrementa el número de generaciones mediante el cultivo *in vitro*, se reduce la multipotencia de las células madre. Por consiguiente, resulta necesario un método de cultivo capaz de mantener la multipotencia deseada de las células madre. Al utilizar el método de cultivo de la invención, las células madre muestran una multipotencia superior para diferenciarse en miocitos, osteocitos o similares, en comparación con métodos de cultivo existentes. Además, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo obtenidas según el método de cultivo de la invención conservan favorablemente la actividad inmunomoduladora inherente y muestran efectos todavía más excelentes. Es decir, en el caso de que las células madre se incuben en un medio de expansión que contiene bFGF o EGF según la presente invención, se mantienen mejor la multipotencia y actividad inmunomoduladora como características inherentes de las células madre, consiguiendo de esta manera efectos clínicamente superiores.

20 Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo es conocido que no inducen una respuesta inmunológica frente a las células alogénicas, pero presentan actividad inmunomoduladora de inhibición de la respuesta inmunológica inducida. La presente invención propone el posible uso de células madre adiposas alogénicas para el tratamiento de las fístulas. Por ejemplo, al añadir células madre adiposas bajo condiciones de activación de las células mononucleares sanguíneas periféricas de pacientes con enfermedad de Crohn, puede suprimirse (o controlarse) la respuesta inmunológica. En este caso, las células madre alogénicas presentan sustancialmente funciones iguales o mejores a las de las células madre autólogas. Por lo tanto, las células madre adiposas alogénicas pueden utilizarse eficazmente para tratar las fístulas causadas por la enfermedad de Crohn u otros tipos de fístulas.

30 Las células madre estromales utilizadas para el trasplante en la presente invención pueden prepararse mediante el cultivo en uno a diez pases, y preferentemente por lo menos 50%, y más preferentemente por lo menos 80%, de dichas células madre son positivas para CD10, C13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 y Oct 4, siendo negativas para CD34, CD45, CD 104, CD 106 y Stro-1.

35 Los detalles de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la descripción detallada a continuación.

En el presente contexto, la expresión "fracción vascular estromal (FVE)" se refiere a células aisladas a partir de tejido adiposo y se refiere al grupo de células que queda tras la eliminación de la mayoría de los adipocitos maduros mediante el tratamiento del tejido adiposo con colagenasa y un procedimiento de centrifugación.

40 La expresión "células madre estromales derivadas de tejido adiposo" se refiere a células madre mesenquimales obtenidas de la FVE y a las que también puede hacerse referencia como "células madre derivadas de tejido adiposo (FVE)", "células madre adultas derivadas de tejido adiposo (CMADTA)", "células madre adiposas", o similares.

45 El término "fístula" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un canal anormal generado en el cuerpo. Entre los ejemplos de dichas fístulas pueden incluirse fístula-en-ano, fístula anorrectal, fístula rectovaginal, fístula de vejiga, fístula entérica, fístula fecal, o similares, sin encontrarse particularmente limitados a los mismos.

50 El término "trasplante alogénico" se refiere al trasplante de un tejido, órgano o células específicos de otro u otros individuos de la misma especie y, más particularmente, el trasplante de un tejido, órgano o células específicos de otra persona u otros animales en el caso en que no puedan utilizarse tejido, órgano o células autólogos.

55 La presente invención incluye principalmente una FVE a partir de tejido adiposo autólogo o alogénico y el cultivo de células madre estromales derivadas de tejido adiposo a partir de la FVE, y dichos procedimientos ya han sido informados. La presente invención propone un método para la producción de un número clínicamente eficaz de células para el tratamiento de fístulas mediante la mejora del método convencional propuesto en la patente US nº 6.777.231. Más particularmente, la patente US nº 6.777.231 da a conocer un método que incluye, mediante la utilización de colagenasa para tratar el tejido adiposo obtenido mediante liposucción y la preparación de una FVE, la incubación del grupo celular obtenido, es decir, la FVE en un medio estromal que consiste de DME o DME/F12 (medio de Eagle modificado por Dulbecco/caldo nutritivo F-12 de Ham) que contiene suero bovino al 10% y el cultivo de las células incubadas durante como mínimo un pase tras crecer hasta cubrir 80% a 90% (de un recipiente de cultivo). Por otra parte, la presente invención incluye incubar una FVE en un medio estromal durante 24 horas y después someter las células incubadas a un medio de expansión que es medio estromal que contiene bFGF o EGF. Según la presente invención, puede prepararse el medio de expansión mediante la adición de 0,1 a 100 ng/ml y, preferentemente, 1 a 10 ng/ml de bFGF o EGF a un medio estromal, incrementando de esta manera la tasa de proliferación celular, manteniendo la multipotencia y la actividad inmunomoduladora. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de producción celular mejorado.

Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo en la presente invención pueden obtenerse a partir de tejido graso subcutáneo humano mediante liposucción o extirpación quirúrgica, sin encontrarse particularmente limitadas a las mismas.

5 Las células madre estromales derivadas de tejido adiposo autólogo y/o alogénico utilizadas para el trasplante en la presente invención pueden obtenerse según los procedimientos siguientes, con la condición de que un medio base para el cultivo celular no se encuentre particularmente limitado a la descripción siguiente.

10 (1) Separación de FVE del tejido adiposo obtenido mediante liposucción.

Tras lavar el tejido adiposo con una solución de KRB y tratarse con colagenasa, se lleva a cabo la centrifugación. Se elimina la capa superior de lípido y se añade una capa inferior de solución salina fisiológicamente adecuada (es decir, solución de tampón fosfato (PBS)) para formar una suspensión. A continuación, se lleva a cabo una centrifugación para recuperar una capa inferior que comprende una FVE.

15 (2) Incubación de la FVE en medio estromal

Tras suspender la FVE en un medio estromal, la suspensión se inocula en un recipiente de cultivo hasta alcanzar una densidad de entre 10.000 y 40.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultiva en el mismo. El medio estromal es un medio que incluye DMEM o DMEM/F12 (medio de Eagle modificado por Dulbecco/caldo nutritivo F-12 de Ham) que contiene suero de feto bovino al 10% y se utiliza para cultivar la FVE durante 24 horas.

20 (3) Incubación en un medio de expansión

Tras eliminar el medio estromal, se añade medio de expansión para la proliferación de células adherentes (o aglutinantes). El medio de expansión puede ser DMEM o DMEM/F12 que incluye suero de feto bovino al 10% y EGF con una concentración de 0,1 a 100 ng/ml o bFGF con una concentración de 0,1 a 100 ng/ml, que funciona acelerando la proliferación de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo (adherentes o aglutinantes), incrementando considerablemente de esta manera el número de células en un tiempo corto.

25 (4) Subcultivo

Tras cubrir las células 80% a 90% del fondo del recipiente de cultivo, se elimina el medio de expansión y se lleva a cabo un tratamiento con tripsina para recolectar las células del recipiente de cultivo. Para el subcultivo, las células deberían diluirse en una proporción de 1:3 a 1:4; después, se cultivan utilizando un medio de expansión en un nuevo recipiente de cultivo. Mediante los mismos procedimientos descritos anteriormente, puede llevarse a cabo un subcultivo adicional.

30 (5) Confirmación de la actividad inmunomoduladora

Debido a que las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénico presentan diferentes actividades inmunomoduladoras según los tipos (individuales) de los mismos, tras observar e identificar la actividad inmunomoduladora de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo obtenidas tras por lo menos una generación de subcultivo, puede seleccionarse y utilizarse una célula estromal derivada de tejido adiposo alogénico que presenta una capacidad inmunosupresora excelente, consiguiendo de esta manera efectos clínicos superiores a los obtenidos con células autólogas.

Breve descripción de los dibujos

50 Los objetivos anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la descripción detallada siguiente, considera conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

55 la FIG. 1 es un gráfico que ilustra el CPDL de las células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión,

la FIG. 2 es un gráfico que ilustra el rendimiento de células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión durante 20 días,

la FIG. 3 es una fotografía (x40) que muestra la diferenciación en miocitos de las células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión,

60 la FIG. 4 es una fotografía (x40) que muestra la diferenciación en osteocitos de las células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión,

la FIG. 5 ilustra la inmnoogenicidad de las células madre adiposas,

la FIG. 6 ilustra la actividad inmunosupresora de las células madre adiposas durante la RML,

65 la FIG. 7 ilustra la actividad supresora de la secreción de IFN- $\gamma$  de células madre adiposas autólogas y alogénicas con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA,

la FIG. 8 ilustra la actividad supresora de la secreción de TNF- $\alpha$  de células madre adiposas autólogas y alogénicas con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA,  
 la FIG. 9 ilustra la actividad supresora de la secreción tanto de IFN- $\gamma$  como de TNF- $\alpha$  (n=9) de células madre adiposas cultivadas en un medio estromal y un medio de expansión, con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA,  
 la FIG. 10 son fotografías (x40) que muestra la actividad de secreción de proteínas en la matriz extracelular de las células madre adiposas, y  
 la FIG. 11 son fotografías que muestra una fístula-en-ano antes y después del trasplante de células madre adiposas.

Mejor modo

A continuación se describen en detalle realizaciones preferentes y ejemplos de la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos se proporciona a título ilustrativo y no pretenden ser limitativos de la invención.

EJEMPLO 1 - método de cultivo de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano

El tejido adiposo se obtiene generalmente mediante liposucción, sin encontrarse particularmente limitado a la misma.

Las células estromales derivadas de tejido adiposo se aislaron de lipoaspirados siguiendo los procedimientos siguientes: el tejido adiposo obtenido se lavó tres o cuatro veces utilizando un volumen igual de solución KRB con el fin de eliminar la sangre del tejido adiposo. Mediante la adición de un volumen igual de solución de colagenasa al tejido adiposo se llevó a cabo la reacción en un baño de agua a 37°C. Se introdujo el producto de reacción en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 20°C y 1.200 rpm durante 10 minutos. Tras eliminar una capa de grasa en forma de sobrenadante, la solución de colagenasa restante en forma de capa inferior se separó suavemente sin agitación. Se añadió un medio estromal a la solución de colagenasa para preparar una suspensión, seguido de centrifugación a 20°C y a 1.200 rpm durante 5 minutos. La parte sedimentada era una fracción vascular estromal, es decir, FVE, mientras que se descartó el sobrenadante.

Se suspendió la FVE en el medio estromal, se inoculó en un recipiente de cultivo y se cultivó durante 24 horas en un incubador a 37°C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Tras eliminar el medio de cultivo y lavar la FVE con solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo, 'PBS'), se hizo proliferar la FVE en un medio estromal, un medio estromal que contenía bFGF con una concentración de 1 ng/ml, o un medio estromal que contenía EGF con una concentración de 5 ng/ml. Tras cultivar las células estromales derivadas de tejido adiposo hasta cubrir 80% a 90% del recipiente de cultivo, las células se sometieron a tratamiento de tripsina para aislar y obtener células individuales. Las células individuales obtenidas se diluyeron hasta una proporción de 1:3 a 1:4, utilizando un medio de expansión, seguido del subcultivo.

La FIG. 1 es un gráfico que ilustra la CPDL de las células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión, y la FIG. 2 es un gráfico que ilustra el rendimiento de células madre adiposas incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión durante 20 días. Tal como se muestra en estas figuras, se encontró que, al incubar las células madre adiposas en el medio de expansión, que era un medio estromal con bFGF o EGF, la tasa de crecimiento de las células era aproximadamente 3 veces superior que al utilizar un medio estándar, es decir, el medio estromal solo. Al incubar 1,5x10<sup>6</sup> células en cada uno de los medios anteriormente indicados durante 20 días, el rendimiento celular medio fue de 9,7x10<sup>6</sup> en el medio estromal y de 1,9x10<sup>8</sup> en el medio de expansión, respectivamente. En consecuencia, puede observarse que las células en el medio de expansión pueden recolectarse aproximadamente 20 veces más en el medio estromal.

La TABLA 1 a continuación muestra el tiempo de duplicación y los rendimientos celulares según los medios de cultivo.

TABLA 1

	Medio estromal	Medio estromal + bFGF
Tiempo de duplicación	122 horas	48 horas
Rendimiento celular*	9,7x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>
(*) Número medio de células obtenido mediante la incubación de 1,5x10 <sup>6</sup> células en cada medio durante 20 días.		

Es conocido que las células madre adiposas pueden someterse a subcultivo durante 10 ó más pases, sin variación de la tasa de proliferación y fenotipo. Al utilizar un medio de cultivo estándar con un medio estromal para subcultivar 1x10<sup>6</sup> células madre adiposas, el número de células obtenido es de aproximadamente 3,8x10<sup>9</sup>. Por otra parte, se obtienen aproximadamente 1,5x10<sup>13</sup> células utilizando el medio de expansión según la presente invención, que es aproximadamente 4.000 veces el número de células obtenido al utilizar el medio estromal anteriormente indicado.

En el caso de que se cultiven utilizando los medios respectivos 50 ml y 100 ml de tejidos adiposos obtenidos mediante liposucción, los tiempos de cultivo necesarios para producir  $1 \times 10^8$  células se muestran en la Tabla 2, a continuación.

TABLA 2

	Medio estromal	Medio estromal + bFGF
50 ml	Mínimo: 30 días	Dentro de los 15 días
100 ml	Mínimo: 20 días	Dentro de los 13 días

5 Aunque las causas y/o motivos exactos no se conocen con claridad, la tasa de proliferación de las células madre adiposas varía según los individuos y, debido a que la proliferación de las células estromales derivadas de tejido adiposo no se encuentra activa durante el cultivo *in vitro*, en ocasiones puede fracasar el cultivo celular.

10 La TABLA 3 a continuación muestra los resultados del cultivo de células madre adiposas en el que se obtuvieron 50 ml de un tejido adiposo a partir de 7 donantes diferentes y se prepararon células madre adiposas a partir del tejido adiposo y se cultivaron en los medios respectivos. Al llevar a cabo el cultivo utilizando el medio de expansión según la presente invención, el tiempo de cultivo necesario para obtener  $1 \times 10^8$  células estaba comprendido entre 13 y 18 días. Por otra parte, al utilizar un medio estromal según un método de cultivo estándar, el tiempo de cultivo era de aproximadamente 25 a 35 días en cuatro (4) lotes. Además, para tres (3) lotes, fracasó la producción celular debido a que la proliferación celular no era suficiente.

TABLA 3

nº de lote	Medio de expansión (medio estromal + bFGF)	Medio estromal
1	16 días	26 días
2	18 días	35 días
3	13,5 días	La producción celular resultó imposible
4	13 días	27,5 días
5	13,7 días	25 días
6	14 días	La producción celular resultó imposible
7	14,5 días	La producción celular resultó imposible

EJEMPLO 2 - marcador de superficie celular de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano

20 Las células estromales derivadas de tejido adiposo obtenidas mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se introdujeron en un tubo de centrífuga de 1,5 ml. Tras añadir 1 ml de una solución de tinción de FACS (PBS que contenía suero de feto bovino al 1%) a la misma y mezclarla homogéneamente, se llevó a cabo la centrifugación a 10.000 rpm durante 5 segundos. Tras separar el sobrenadante, el producto restante se suspendió en 1 ml de solución de tinción de FACS y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 segundos. Tras separar el sobrenadante, el producto restante se resuspendió en 300 µl de la solución de tinción de FACS. La muestra resultante se distribuyó entre nuevos tubos de centrífuga, de manera que se introdujeron aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^6$  células en cada uno de los tubos de centrífuga, considerando el número de muestras. Tras añadir un anticuerpo a las mismas, el contenido en el tubo se sometió a reacción a 4°C durante 30 minutos. A continuación, el producto de reacción se resuspendió en 1 ml de solución de tinción de FACS y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 segundos, seguido de la separación del sobrenadante. El producto restante se resuspendió mediante la adición de 400 a 500 µl de una solución de fijación de FACS al mismo. La suspensión obtenida se sometió a análisis utilizando un citómetro de flujo.

35 Tal como se muestra en la TABLA 4, a continuación, se encontró como resultado del análisis que por lo menos 95% de las células madre adiposas proliferadas en la presente invención mostraban una respuesta positiva a CD10, CD13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 y Oct4, y una respuesta negativa a STRO-1, CD34, CD45, CD104 y CD 106. Sin embargo, en el caso de CD34, aproximadamente 5% a 10% de las células madre adiposas en ocasiones mostró una respuesta positiva en p0, según el lote de tejido adiposo. No se observaron diferencias basadas en las condiciones de cultivo.

TABLA 4

Pase de cultivo	p0			p1			p2			p3		
	Medio estromal	EFG	bFGF	Medio estromal	EFG	bFGF	Medio estromal	EFG	bFGF	Medio estromal	EFG	bFGF
CD10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD34	-/+	-/+	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



CD59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
STRO-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### EJEMPLO 3 - capacidad de diferenciación de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano

5 Tras cultivar las células estromales derivadas de tejido adiposo mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 hasta cubrir 80% a 90% de un recipiente de cultivo, las células en cultivo se sometieron a tratamiento de tripsina para aislar y obtener células individuales.

10 Con el fin de identificar la capacidad de diferenciación miogénica de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas utilizando cada uno de los diferentes medios, las células se inocularon en cuatro (4) pocillos de manera que cada pocillo contuviese aproximadamente 5.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células inoculadas se cultivaron para llenar aproximadamente 80% del recipiente de cultivo, cambiando el medio. Tras llenar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo el 100% del recipiente de cultivo, se descartó el medio utilizado y se sustituyó por medio de diferenciación de miocitos fabricado por Promocell y se indujo durante 2 semanas la diferenciación de las células madre en miocitos. Con el fin de determinar la tasa de diferenciación en miocitos, se  
15 llevó a cabo tinción de inmunofluorescencia mediante los procedimientos siguientes: las células madre se lavaron tres veces utilizando PBS y se fijaron utilizando PBS que contenía formaldehído al 4% durante 30 minutos. A continuación, tras lavar las células fijadas tres veces con PBS, el producto lavado se sometió a permeabilización y se bloqueó utilizando PBS que contenía suero de cabra normal al 5% y Triton X-100 al 0,1% durante 30 minutos. Tras añadir PBS que incluía anticuerpos primarios de desmina y miosina que eran específicos para los miocitos a las  
20 células y seguidamente hacerlas reaccionar a 37°C durante 1 hora, el producto de reacción se lavó tres veces con PBS y se sometió a reacción utilizando un anticuerpo secundario durante 30 minutos. Tras lavar el producto nuevamente tres veces con PBS, se aplicó en el mismo una solución de montaje y se observó mediante microscopía de fluorescencia.

25 La FIG. 3 son fotografías (x40) que muestran la diferenciación en miocitos de células madre adiposas que habían sido incubadas en un medio estromal o en un medio de expansión, Tal como se muestra en la FIG. 3, en comparación con el cultivo en el que se utilizó el medio estromal, se observaron muchas más células positivas para desmina y miosina en las células madre estromales derivadas de tejido adiposo obtenidas mediante el cultivo con medio de expansión que contenía bFGF. Es decir, según la presente invención, al incubar células madre estromales  
30 derivadas de tejido adiposo en un medio preparado mediante la adición de bFGF al medio estromal, puede observarse que se mejora la tasa de diferenciación en miocitos.

35 Con el fin de identificar la diferenciación en osteocitos de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas utilizando cada uno de los diferentes medios, las células se inocularon en doce (12) pocillos de manera que cada pocillo contuviese aproximadamente 20.000 células/cm<sup>2</sup>. Las células inoculadas se cultivaron para llenar aproximadamente 100% del recipiente de cultivo, cambiando el medio. Tras llenar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo el 100% del recipiente de cultivo, se descartó el medio utilizado y se sustituyó por medio de diferenciación en osteocitos, que incluía 100 µg/ml de ácido ascórbico, glicerosulfato 10 nM, dexametasona 100 nM y vitamina D3 10 nM, y se indujo la diferenciación de las células madre en osteocitos durante 4 semanas. Con el  
40 fin de determinar la tasa de diferenciación en osteocitos, se llevó a cabo tinción de von-Kossa mediante los procedimientos siguientes: las células madre se lavaron tres veces utilizando PBS y se fijaron utilizando PBS que contenía formaldehído al 4% durante 20 minutos. A continuación, tras lavar las células fijadas tres veces con agua destilada, se les añadió una solución de nitrato de plata al 5% y se expusieron a radiación UV durante 1 hora. Tras lavar el material expuesto tres veces con agua destilada y añadir solución de tiosulfato sódico al 5%, se llevó a cabo  
45 la reacción durante 2 minutos. Tras lavar el producto de reacción tres veces con agua destilada, se aplicó una solución de montaje al mismo y se observaron las células con un microscopio.

50 La FIG. 4 son fotografías (x40) que muestran la diferenciación en osteocitos de las células madre adiposas cultivadas en un medio estromal o en un medio de expansión, Tal como se muestra en la FIG. 4, las células madre estromales derivadas de tejido adiposo mediante el cultivo con medio de expansión que contenía EGF o bFGF mostraron tinción de von-Kossa considerablemente incrementada en comparación con el cultivo con el medio estromal. Es decir, según la presente invención, al incubar células madre estromales derivadas de tejido adiposo en un medio de expansión preparado mediante la adición de bFGF o EGF al medio estromal, puede conseguirse una  
55 diferenciación mejorada de las células madre.

### EJEMPLO 4 - actividad inmunomoduladora de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano

Según un resultado de análisis de antígeno leucocitario humano (HLA), se seleccionaron siete (7) tipos de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) humanas que presentaban diversas combinaciones de HLA de tipos

I y II y células madre estromales derivadas de tejido adiposo, seguido de la implementación de la reacción de linfocitos mixtos (MLR). Se añadieron las PBMC contenidas en cada lote, como células respondedoras, a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U hasta alcanzar  $2 \times 10^5$  células/pocillo. A continuación, se añadieron las células madre estromales derivadas de tejido adiposo en cada lote, a modo de estimuladoras, en una cantidad de  $2 \times 10^4$  células a cada pocillo. A modo de control positivo se trataron  $2 \times 10^4$  células PBMC con mitomicina C y se añadieron al pocillo. El día 3 después de la reacción se recogió un sobrenadante y se sometió a la medición de la cantidad de IFN- $\gamma$  secretado utilizando el método ELISA.

La FIG. 5 ilustra la inmunogenicidad de las células madre adiposas. Tal como se muestra en la presente figura, para las PBMC como control positivo, reaccionar con las PBMC alogénicas, resultando en la secreción de un gran cantidad de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, las PBMC anteriormente indicadas que habían reaccionado con las células madre estromales derivadas del tejido adiposo cultivadas según el Ejemplo 1, no mostraron secreción de IFN- $\gamma$  o mostraron un nivel de IFN- $\gamma$  sustancialmente similar al de PBMC autólogas. Es decir, puede observarse que las células madre estromales derivadas del tejido adiposo no inducen una respuesta inmunológica frente a las PBMC alogénicas.

Según otra realización, se inocularon dos (2) lotes que contenían diferentes PBMC en una cantidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U para inducir una respuesta inmunológica; después, se añadieron células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénico cultivadas según el Ejemplo 1, en un número de 5.000, 10.000 y 20.000, respectivamente, a los pocillos. Tras incubar durante 72 horas, se extrajo un sobrenadante de cada uno de los pocillos y se sometió a la medición de un nivel de secreción de IFN- $\gamma$ .

La FIG. 6 ilustra la actividad inmunosupresora de las células madre adiposas durante la RML. Tal como se muestra en esta figura, puede observarse que se suprime (o se controla) la respuesta inmunológica en proporción al número de células añadidas en el caso de que se añadiesen al pocillo las células madre estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas según el Ejemplo 1. En otras palabras, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo no inducen una respuesta inmunológica por parte de las células T alogénicas y reducen considerablemente la secreción de IFN- $\gamma$ , que es secretada en grandes cantidades por las células inmunológicas al producirse la respuesta inmunológica, incrementando de esta manera la actividad inmunológica y presentando de esta manera una actividad inmunosupresora.

EJEMPLO 5 - actividad inmunomoduladora de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano alogénico

Con el fin de identificar las actividades inmunosupresoras de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo autólogas y alogénicas, se activaron las PBMC obtenidas de cuatro (4) donantes diferentes, utilizando fitohemaglutinina (PHA) y se midió la cantidad de secreción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  de las mismas. Tras la inoculación de células madre estromales derivadas de tejido adiposo autólogas o alogénicas en una cantidad de 10.000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se añadieron  $1 \times 10^5$  células/pocillo de PBMC a los pocillos, seguido de la inducción de respuesta inmunológica utilizando PHA. Tras 72 horas, se separó un sobrenadante y se midió el nivel de secreción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

La FIG. 7 ilustra la actividad supresora de la secreción de IFN- $\gamma$  de las células madre adiposas autólogas y alogénicas con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA, y la FIG. 8 ilustra la actividad supresora de la secreción de TNF- $\alpha$  de las células madre adiposas autólogas y alogénicas con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA. Tal como se muestra en las FIGS. 7 y 8, el nivel de secreción de IFN- $\gamma$  o de TNF- $\alpha$  se redujo considerablemente en células madre estromales derivadas de tejido adiposo tanto autólogas como alogénicas al añadir a los pocillos células madre estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas según el Ejemplo 1. Concretamente, debido a que las células madre estromales derivadas de tejido adiposo alogénicas muestran actividades inmunomoduladoras sustancialmente diferentes según el tipo (individuo) de las mismas, pueden conseguirse excelentes efectos clínicos en el caso de que se criben y se utilicen células estromales derivadas de tejido adiposo con actividades inmunosupresoras superiores, en comparación con células estromales autólogas.

En otras palabras, las células madre derivadas de tejido adiposo alogénicas pueden controlar la respuesta inmunológica inducida por mitógeno que activa las células inmunológicas, presentando de esta manera actividad inmunosupresora, y dicha actividad es sustancialmente igual o superior a la de las células madre derivadas de tejido adiposo autólogas.

EJEMPLO 6 - actividad inmunomoduladora de células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano producidas en medio estromal o en medio de expansión

Con el fin de comparar la actividad inmunomoduladora de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano cultivadas en un medio estromal o en un medio de expansión, se cultivaron las células madre adiposas obtenidas de tres (3) donantes diferentes utilizando el medio estromal o el medio de expansión dado a conocer en la presente invención, respectivamente. Las PBMC proporcionadas por tres donantes diferentes se activaron utilizando PHA y después se midieron los niveles de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$  mediante la adición de las células madre adiposas anteriormente indicadas a las PBMC activadas. Tras la inoculación de células madre estromales derivadas de tejido

adiposo en una cantidad de 10.000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se añadieron  $1 \times 10^5$  células/pocillo de PBMC a los pocillos, seguido de la inducción de respuesta inmunológica utilizando PHA. Tras 72 horas, se separó un sobrenadante y se midió el nivel de secreción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

5 La FIG. 9 ilustra las actividades supresoras de la secreción tanto de IFN- $\gamma$  como de TNF- $\alpha$  (n=9) de células madre adiposas incubadas en un medio estromal y en un medio de expansión, con respecto a la respuesta inmunológica estimulada por PHA. Tal como se muestra en la FIG. 9, puede observarse que, al añadir las células madre estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas en el medio de expansión según el Ejemplo 1, se incrementaron observablemente las actividades supresoras de la secreción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ , en comparación con las células madre producidas utilizando el medio estromal. Es decir, las células madre derivadas de tejido adiposo producidas según la presente invención suprimen (o controlan) más eficazmente la respuesta inmunológica inducida por mitógeno que los métodos de cultivo estándares actuales.

15 EJEMPLO 7 - actividad de secreción de proteínas de la MEC de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano

Las células estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas en el Ejemplo 1 se inocularon en cada pocillo de una placa de cuatro pocillos y se introdujeron en un recipiente de cultivo. Las células se lavaron tres veces utilizando PBS y se fijaron utilizando PBS que contenía formaldehído al 4% durante 30 minutos. A continuación, tras lavar las células fijadas tres veces con PBS, el producto lavado se sometió a permeabilización y se bloqueó utilizando PBS que contenía suero de cabra normal al 5% y Triton X-100 al 0,1% durante 30 minutos. Tras añadir PBS que contenía un anticuerpo primario al material tratado y hacerlo reaccionar a 37°C durante 1 hora, el producto de reacción se lavó tres veces con PBS y se sometió a reacción utilizando un anticuerpo secundario durante 30 minutos. Tras lavar el producto nuevamente tres veces con PBS, el producto lavado se montó mediante la aplicación de una solución de montaje al mismo y se observó mediante microscopía de fluorescencia.

La FIG. 10 son fotografías (x40) que muestra la actividad de secreción de proteínas en la matriz extracelular (MEC) de las células madre adiposas. Tal como se muestra en las fotografías, las células madre adiposas cultivadas según la presente invención mostraron una respuesta positiva a los colágenos de tipos I, III, IV y V, a la fibronectina y a la laminina. Es decir, las células estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas según la presente invención pueden expresar diversos tipos de proteínas de MEC, tales como los colágenos de tipo I, III, IV y V, fibronectina, laminina o similares, permitiendo de esta manera una más fácil injertación celular y/o formación de tejido nuevo al trasplantar las células anteriormente indicadas en un cuerpo.

35 EJEMPLO 8 - ejemplo ilustrativo del tratamiento de la fístula de Crohn con células estromales derivadas de tejido adiposo

Para la aplicación clínica de las células estromales derivadas de tejido adiposo cultivadas mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se llevaron a cabo ensayos clínicos en pacientes con fístula de Crohn. Las células preparadas se cultivaron durante uno a tres pases. A continuación, se trasplantaron las células a una densidad de entre  $1 \times 10^7$  y  $2 \times 10^7$  células/ml a lo largo de la pared de una fístula en un volumen de 4 a 14 ml, según el tamaño de la fístula. Tras el trasplante celular, se llenó la fístula con cola de fibrina.

#### 45 Caso 1:

Una paciente mujer de 24 años de edad había sido diagnosticada con enfermedad de Crohn hace 10 años y sometida a una fistulectomía 2 años atrás. Sin embargo, un año y medio después de la operación, la paciente fue sometida a resección quirúrgica por recurrencia de la enfermedad. A pesar de que se administró azatioprina, Remicade, etc., no mejoró el estado de la enfermedad. Debido a la recurrencia continua de la fístula-en-ano y la inflamación de la misma, el tamaño de la fístula-en-ano era de aproximadamente 5,5 cm (profundidad) x 2 cm (diámetro), presentaba un absceso con descarga de gran cantidad de pus, y se agravó significativamente (ver A de la fig. 11). Mediante la extracción de aproximadamente 50 ml de tejido adiposo del abdomen del paciente, se cultivó el tejido adiposo durante hasta tres pases, obteniendo de esta manera un total de  $2,8 \times 10^8$  células. El periodo de producción total fue de 21 días. Antes del trasplante celular, se realizó un raspado para eliminar el tejido inflamado, y se trasplantaron células a una densidad de  $2 \times 10^7$  células a lo largo del tracto de la fístula desde la parte más interna del mismo. Tras el trasplante, se llenó la fístula con cola de fibrina. En una observación de seguimiento de dos semanas tras el trasplante celular, se encontró que el tracto de la fístula se había cerrado prácticamente y se había producido la epitelización de la mayor parte de la abertura externa. Tras ocho (8) semanas de seguimiento, se observó que la parte de fístula-en-ano se había cerrado por completo y la abertura externa se encontraba completamente epitelizada (se identificó el cierre completo del tracto interno de la fístula mediante ligero raspado de la parte epitelizada).

#### 65 Caso 2:

Un paciente varón de 24 años de edad había sido diagnosticado con enfermedad de Crohn hace 10 años y sometida tres veces a fistulectomía durante los últimos 3 años. Sin embargo, presentaba recurrencia continua de la

5 enfermedad y había sido sometido a resección quirúrgica repetida. A pesar de la administración de esteroides, Remicade, etc., no mejoró el estado de la enfermedad. Debido a la recurrencia continua de la fístula-en-ano y la inflamación de la misma, la fístula-en-ano diana se encontraba situada en la posición de las 10 a una distancia de 1 cm del ano, presentaba un tamaño de 7 cm (profundidad) x 1 cm (diámetro) y un absceso con descarga de gran cantidad de pus, y se agravó significativamente (ver B de la fig. 11). Mediante la extracción de aproximadamente 70 ml de tejido adiposo del abdomen del paciente, se cultivó el tejido adiposo durante hasta tres pases, obteniendo de esta manera un total de  $3 \times 10^8$  células. El periodo de incubación total fue de 20 días. Antes del trasplante celular, se realizó un raspado para eliminar el tejido inflamado, y se trasplantaron células a una densidad de  $2 \times 10^7$  células a lo largo del tracto de la fístula desde la parte más interna del mismo. Tras el trasplante, se llenó la fístula con cola de fibrina. A partir del seguimiento durante dos semanas tras el trasplante celular, se encontró que por lo menos la mitad del tracto de la fístula, que presentaba una profundidad original de aproximadamente 7 cm antes del trasplante celular, se encontraba cerrado, con una profundidad remanente de aproximadamente 3 cm. Tras ocho (8) semanas de seguimiento, se observó que la parte de fístula-en-ano se había cerrado por completo y la abertura externa de la misma se encontraba completamente epitelizada (se identificó el cierre completo del tracto interno de la fístula mediante ligero raspado de la parte epitelizada).

La FIG. 11 son fotografías que muestran una fístula-en-ano antes y después del trasplante de células madre adiposas.

20 Tal como se ha ilustrado en los ejemplos clínicos anteriores, puede observarse que una fístula-en-ano que no responde a los fármacos y es continuamente recurrente y difícil de tratar con los métodos convencionales puede tratarse eficazmente utilizando células madre adiposas cultivadas según el método de la invención. Especialmente, tal como se describe en los casos de trasplante 1 y 2, todavía no se ha dado a conocer un método para el tratamiento de una fístula-en-ano grave con, por ejemplo, un tracto de la fístula de gran tamaño, tal como un diámetro de más de 1 cm y/o una profundidad superior a 5 cm. Para la producción de células para el trasplante en una fístula-en-ano, podrían cultivarse grandes cantidades de células madre adiposas mediante la utilización del método de cultivo mejorado del Ejemplo 1. El método de cultivo según la presente invención permite obtener 10 veces más células estromales derivadas de tejido adiposo que el método convencional dado a conocer en el documento nº WO 2006/136244 (28 de diciembre de 2006), mediante el cultivo durante dos o tres pases. Además, los resultados del tratamiento son observables, consiguiendo de esta manera efectos clínicos mejorados.

#### Aplicabilidad industrial

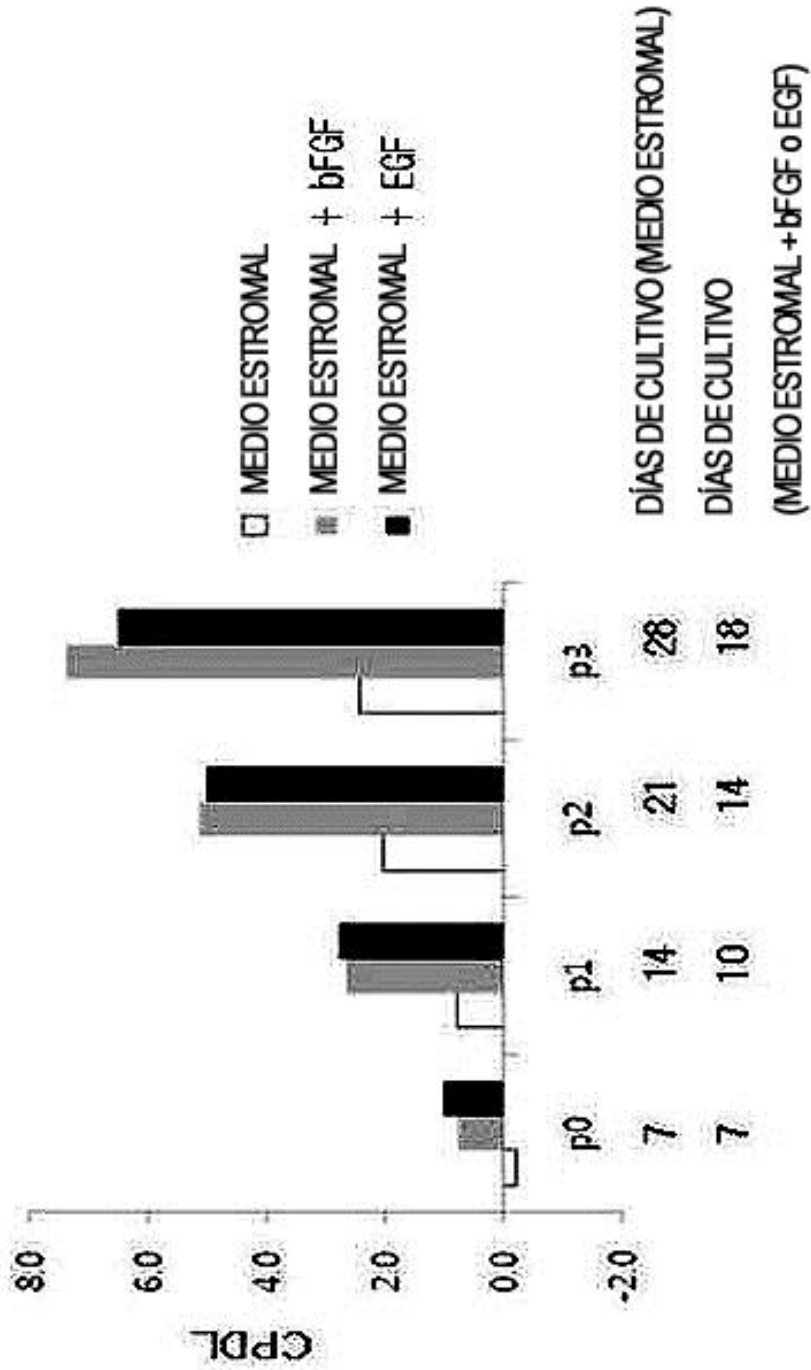
35 Un método de cultivo según la presente invención puede producir eficazmente un número clínicamente eficaz de células madre estromales derivadas de tejido adiposo en un periodo de tiempo corto mediante la mejora de los métodos de cultivo estándares convencionales.

40 La composición de células madre adiposas que contiene células madre estromales derivadas de tejido adiposo obtenidas mediante el método de la presente invención muestra una multipotencia y actividad inmunomoduladora superiores, en comparación con las composiciones celulares producidas mediante métodos convencionales, y de esta manera resulta más adecuada para el tratamiento de fístulas. En especial, las células madre derivadas de tejido adiposo alogénico resultan excelentes en vista de las aplicaciones clínicas

**REIVINDICACIONES**

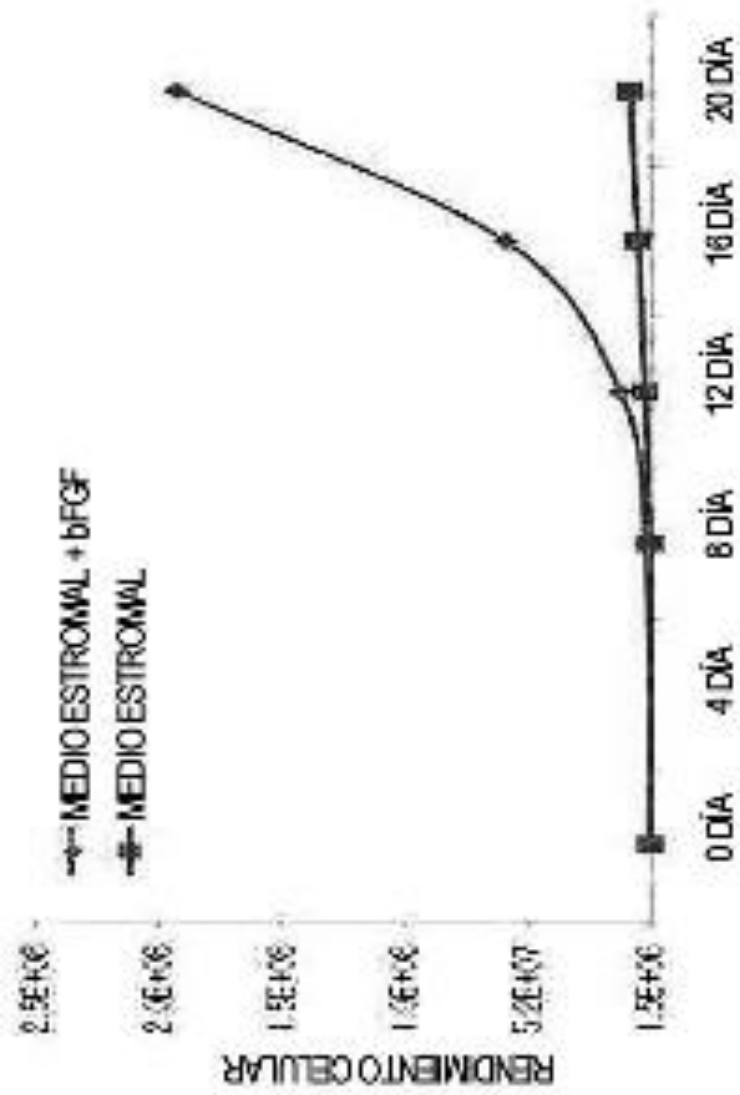
1. Método para la producción de una composición de células madre adiposas, que comprende células madre estromales derivadas de tejido adiposo, comprendiendo el método las etapas siguientes:
- 5 (a) aislar una fracción vascular estromal ('FVE') a partir del tejido adiposo recogido de un sujeto,  
(b) incubar la FVE en un medio estromal,  
(c) incubar la FVE en un medio de expansión que contiene EGF o bFGF como factor de crecimiento, con el fin de cultivar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo, y  
10 (d) cultivar las células madre estromales derivadas de tejido adiposo durante como mínimo un pase.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de expansión del procedimiento (c) comprende EGF o bFGF en una concentración de entre 0,1 y 100 ng/ml.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el medio de expansión comprende EGF o bFGF en una concentración de entre 1 y 10 ng/ml.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el tejido adiposo se recoge de un sujeto alogénico.
- 20

FIG. 1



\* CPDL: Nivel acumulado de duplicación de la población

FIG. 2



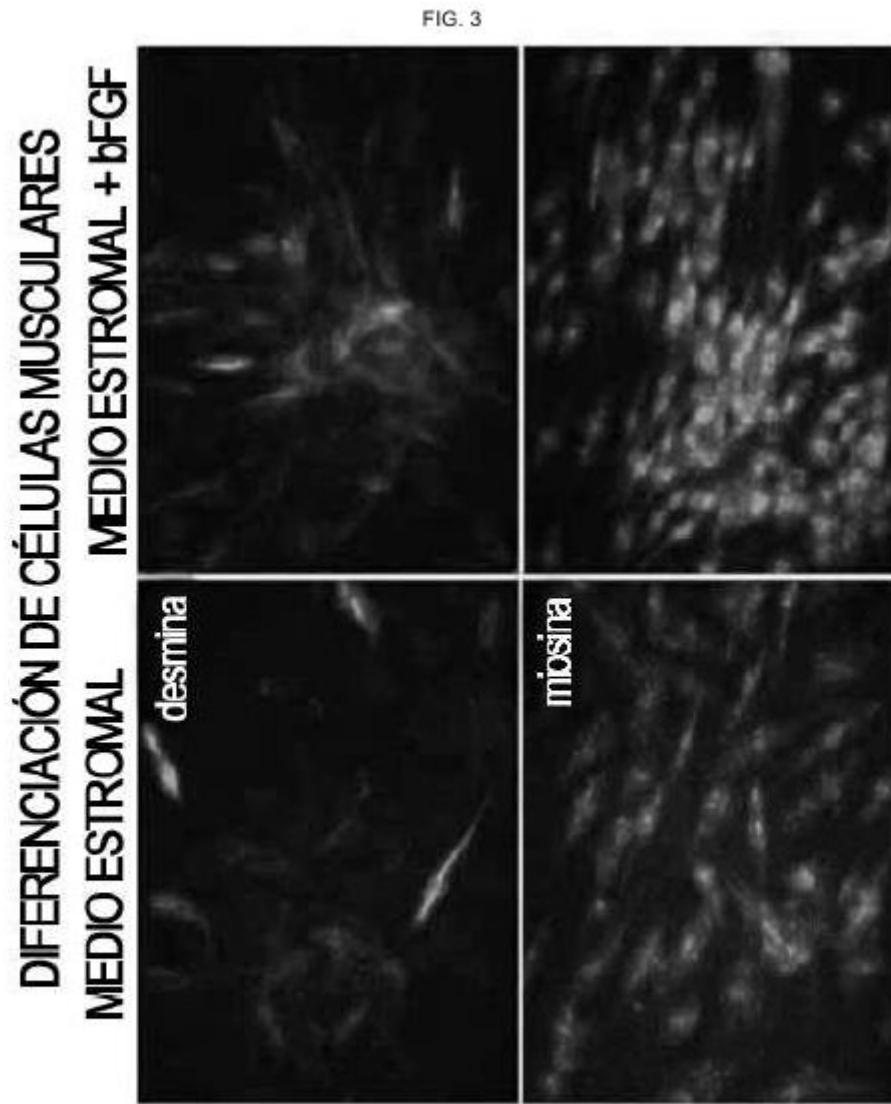




FIG. 4

**DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS ÓSEAS**



FIG. 5

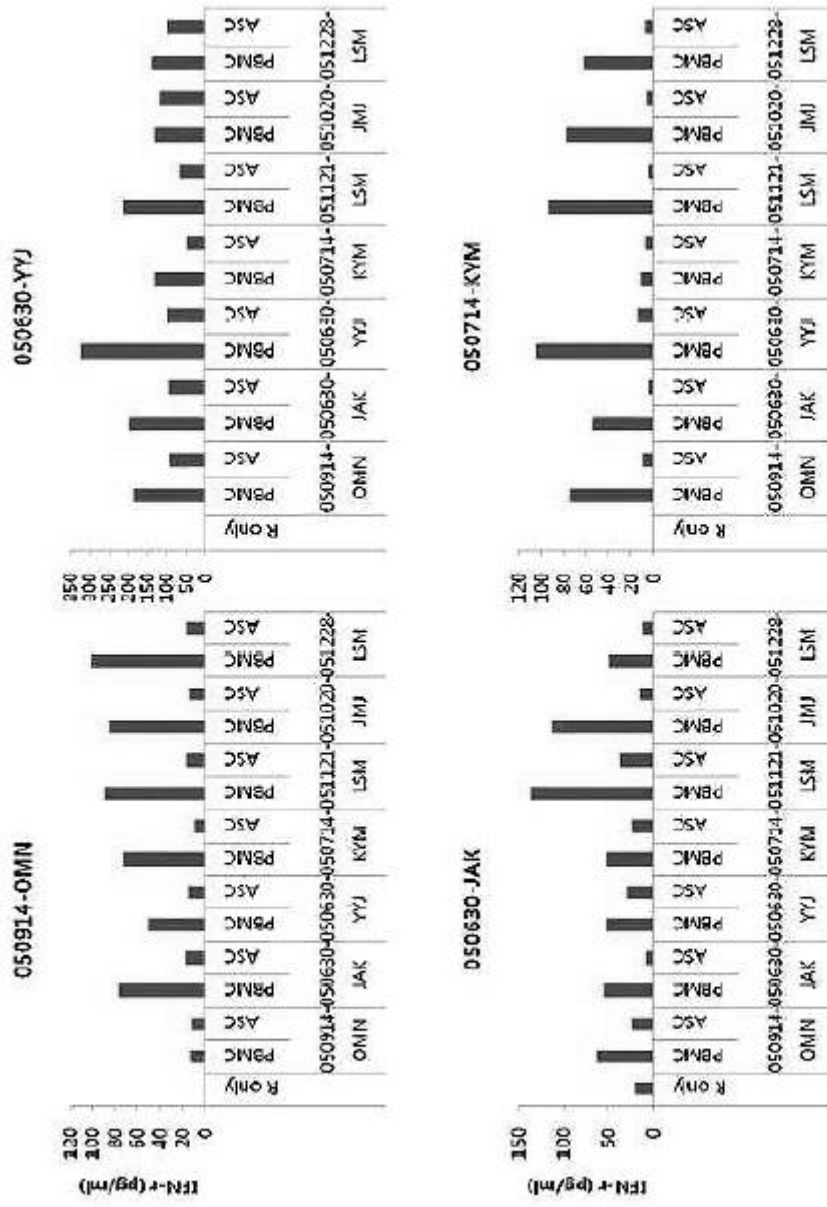


FIG. 6

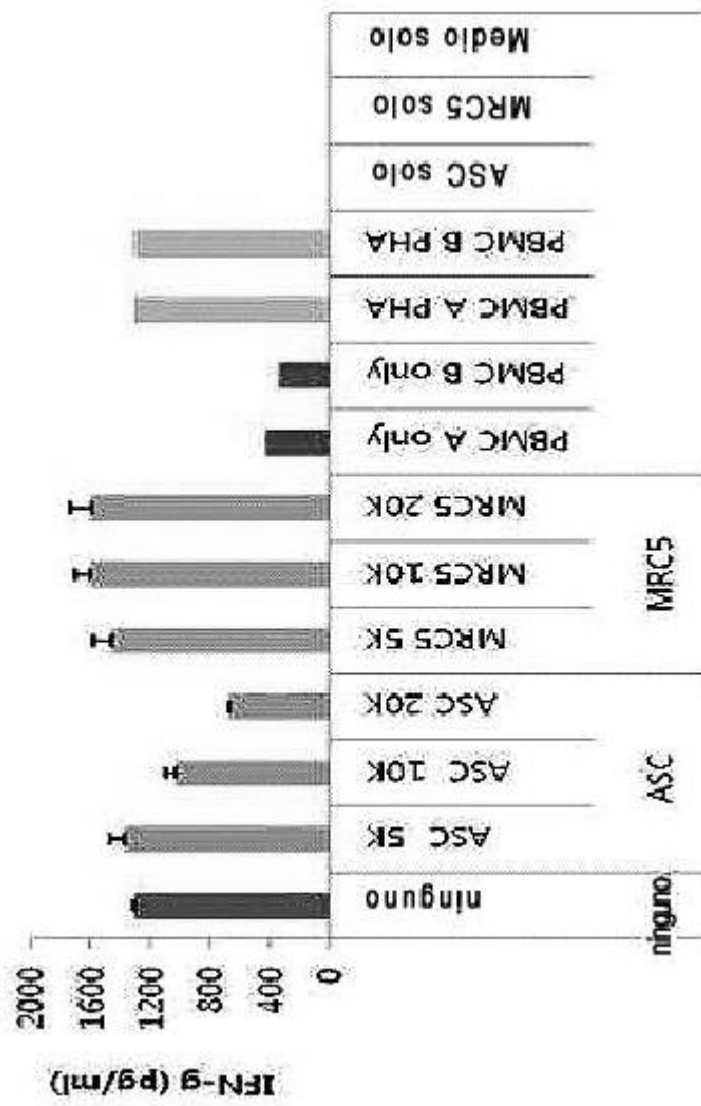


FIG. 7

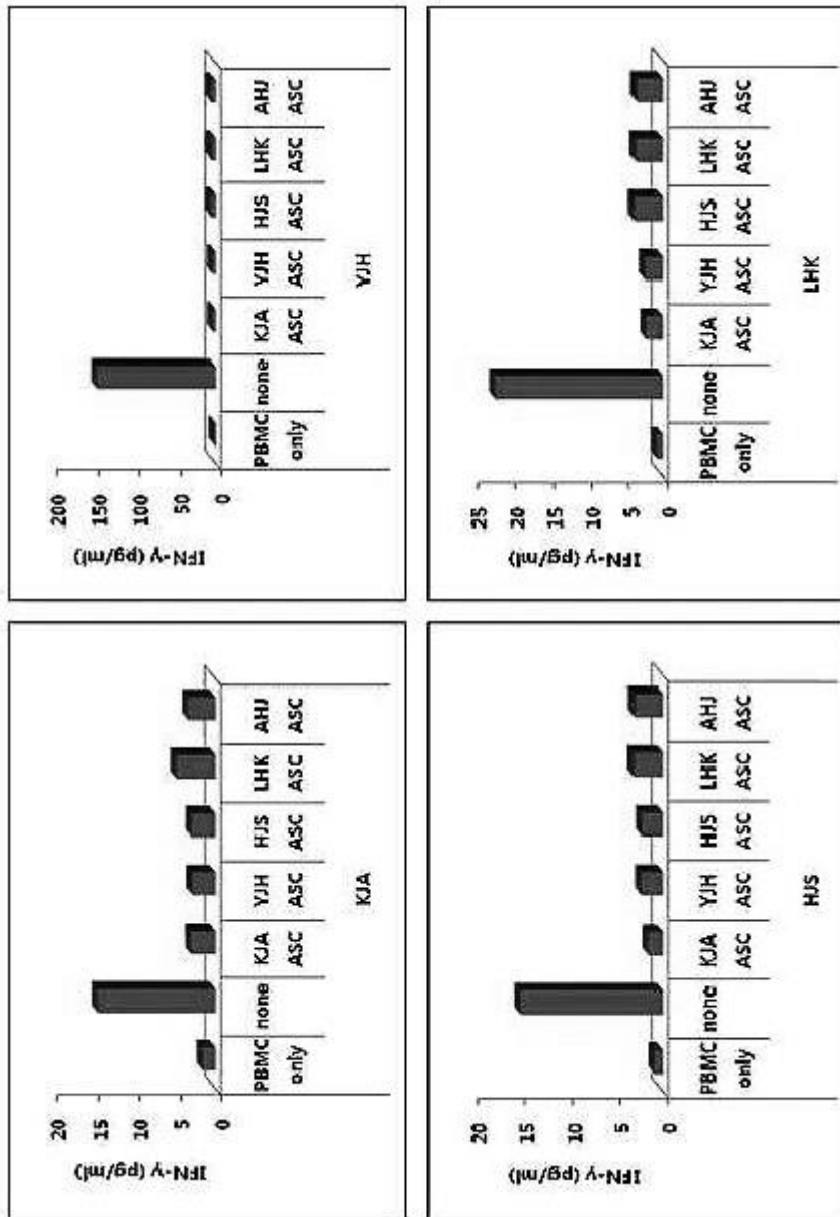
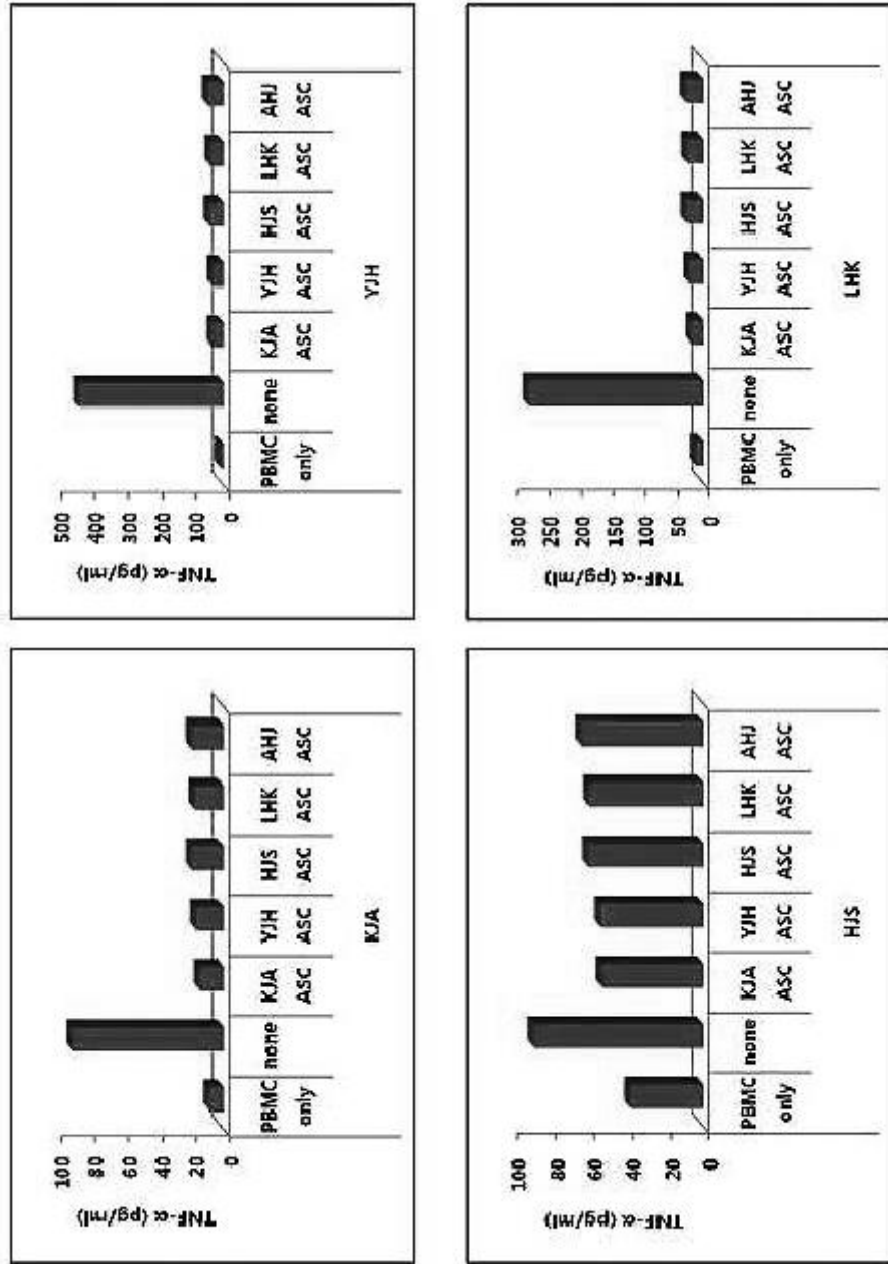


FIG. 8



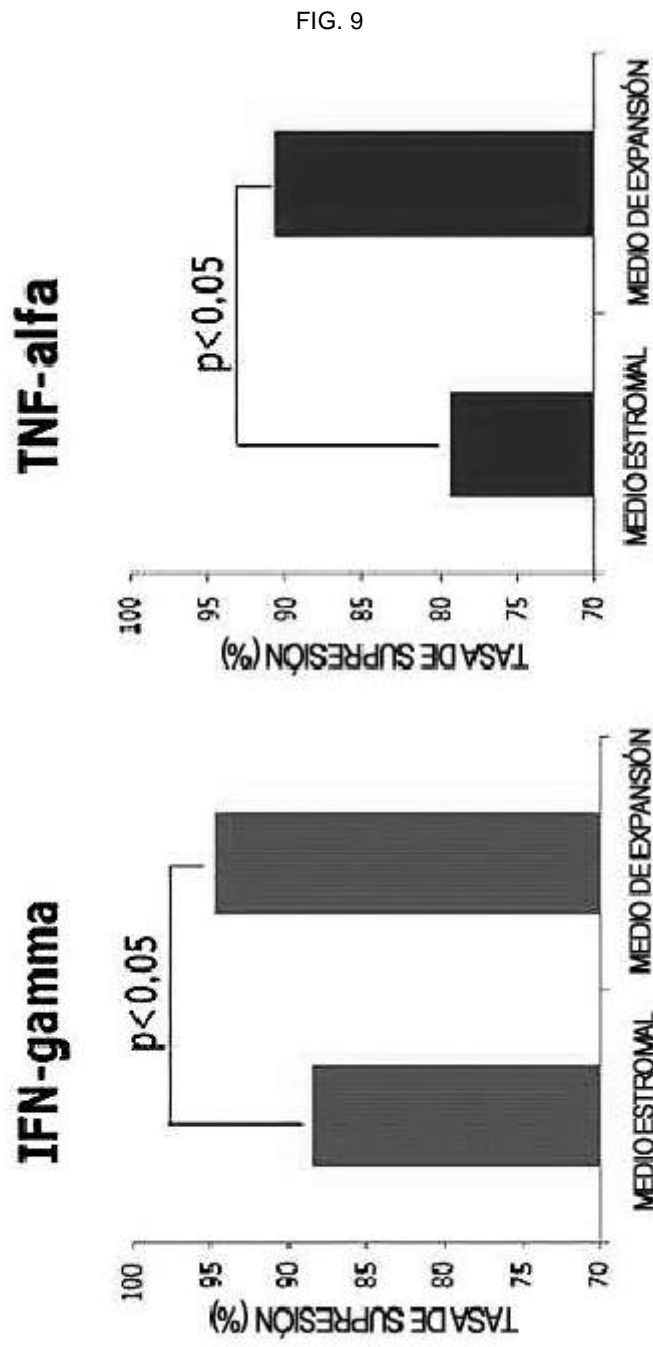


FIG. 10

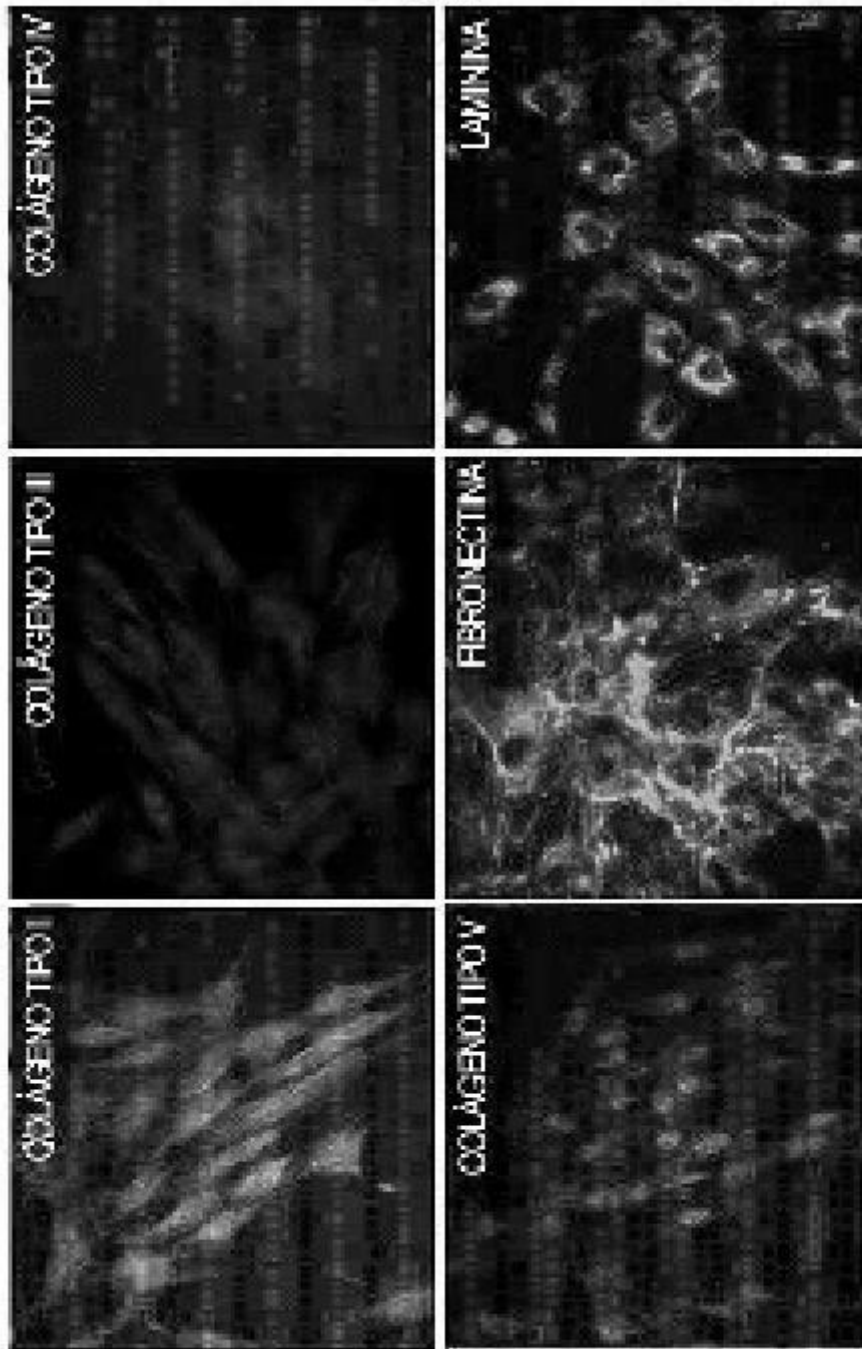


FIG. 11

