

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 039**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61L 27/38** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2009 E 09771581 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2367419**

54 Título: **Composiciones celulares para uso en terapia**

30 Prioridad:

**05.12.2008 GB 0822246**

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

**23.05.2016**

73 Titular/es:

**RENEURON LIMITED (100.0%)  
10 Nugent Road Surrey Research Park  
Guildford Surrey GU2 7AF, GB**

72 Inventor/es:

**HOPE, ANDREW;  
MILJAN, ERIK y  
SINDEN, JOHN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 571 039 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**

Composiciones celulares para uso en terapia

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones de terapia celular y a los métodos de formulación de dichas composiciones.

Antecedentes de la invención

10 El desarrollo de terapias celulares es el objetivo de las investigaciones para el tratamiento de numerosas indicaciones con necesidades actualmente no satisfechas. Tales terapias administradas como una suspensión de células, idealmente requieren el uso de un vehículo que sea compatible con las células, no tóxico para el receptor y adecuado para el almacenamiento de la terapia durante un tiempo suficiente antes y durante la administración.

La preservación de las terapias celulares en condiciones ambientales o de hipotermia (de 2°C a 8°C) es necesaria para los ensayos clínicos en fase temprana de las terapias alogénicas. También es más probable que se utilice para terapias celulares autólogas, que utilizan las propias células de los pacientes como material de partida.

15 La criopreservación es probable que sea necesaria para el almacenamiento a largo plazo de las terapias celulares antes de la administración. Los ensayos multicéntricos en fase posterior requieren tiempos de almacenamiento sustancialmente más largos, lo que se puede lograr mediante el almacenamiento hipotérmico, cuando el producto de células terapéuticas es probable que sea fabricado y distribuido centralmente en un número de meses. En última instancia, la fabricación posterior a la autorización de los productos de terapia celular requerirá un almacenamiento durante numerosos años.

20 El uso del crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) tiene una gran utilidad en la preservación de células en congeladores de nitrógeno líquido (~ -195°C). DMSO es un miembro de la clase de disolventes apróticos dipolares, que también incluye dimetilformamida, N-metil-2-pirrolidona y hexametilfosforamida, y es el crioprotector más común usado en la fabricación y en el almacenamiento de terapias celulares. Sin embargo, este disolvente es tóxico para el producto celular y, consecuentemente, para al paciente tratado (Hubel, 2001; Sauer-Heilborn et al., 2004). Por ejemplo, en los trasplantes de médula ósea, casi todos los pacientes que recibieron células con DMSO criopreservadas sufren efectos secundarios y un pequeño número experimenta complicaciones graves. Se han observado efectos directos durante la infusión y efectos secundarios de aparición tardía en una forma dependiente de la dosis. Los efectos descritos se produjeron cuando la formulación celular se administraba por vía sistémica de modo que se diluyen los ingredientes de la formulación y se distribuyen ampliamente. En contraste, la administración a través de la inyección directa en el tejido (por ejemplo, administración intracraneal, intramuscular o intracardiaca) aumentaría los efectos de toxicidad local. Los métodos para eliminar el contenido de DMSO de las células criopreservadas han reducido las complicaciones relacionadas con el DMSO y sus efectos secundarios (Syme et al., 2004). Sin embargo, estos procesos eran ineficaces porque recuperan tan poco como el 60% del producto celular (Calmels et al., 2003).

35 El uso de glicerol y trehalosa se ha demostrado eficaz en el almacenamiento de los espermatozoides criopreservados (Storey et al., 1998), sin embargo este método se ha encontrado que es ineficaz con diferentes tipos de células.

40 Las formulaciones anteriores de células para administración se han basado en el medio del cultivo celular y en soluciones salinas modificadas. Aunque estas formulaciones sean adecuadas para administración, no conservan la viabilidad del producto celular durante más de unas pocas horas. Esto impide realizar los estudios clínicos, en los que el tiempo necesario para liberar el producto para la administración clínica, seguido por el transporte y el proceso potencialmente largo de implantación (hasta 9 horas en total) pueden hacer que las células no sean viables. Por lo tanto, hay una necesidad de aumentar la vida útil de estos productos más allá de este período de 9 horas con el fin de superar los obstáculos inmediatos de los primeros ensayos clínicos. Además, para que un producto de terapia celular sea comercialmente viable, se necesita una estrategia de almacenamiento de mucho más tiempo.

50 El excipiente HypoThermosol®-FRS (HTS-FRS) (BioLife Solutions, Inc) es una solución de almacenamiento hipotérmico que fue desarrollado inicialmente como un líquido de perfusión que se utiliza durante el paro cardíaco junto con hipotermia profunda, con el fin de minimizar la lesión isquémica. HTS-FRS es una formulación disponible comercialmente diseñada para mediar en el nivel de necrosis post-almacenamiento y la apoptosis en células que experimentan periodos prolongados de preservación de hipotermia (2°C -10°C).

El documento US6921633 describe un método de conservación de una célula, tejido u órgano por contacto de dicha célula, tejido u órgano con una solución de almacenamiento hipotérmico que comprende una composición que inhibe la apoptosis y una concentración suficiente de composición de vitrificación para vitrificar dicha solución.

El documento US6632666 describe una composición a base de gel para uso en el almacenamiento y transporte nanotérmico, hipotérmico o crioprotector de muestras de células que comprenden HTS-FRS y un agente gelificante.

5 El documento WO2005/009766 describe una composición farmacéutica que comprende células del hígado, HTS y DMSO que se pueden almacenar a temperaturas criotérmicas.

Después del almacenamiento de estas composiciones a temperaturas hipotérmicas o criotérmicas, se requiere un procesamiento sustancial del producto de terapia celular con el fin de eliminar los crioprotectores tóxicos antes de la administración. Esto puede conducir a pruebas de liberación adicional, lo que es a la vez costoso y complejo.

10 Por lo tanto, hay una necesidad de composiciones y formulaciones que proporcionen una alternativa al DMSO y que se puedan almacenar a temperaturas criotérmicas y que sea utilizado como un vehículo para la administración directa de las terapias celulares.

#### Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición para uso en terapia, en la que la composición comprende:

15 (i) Trolox,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina, glutatión; y

(ii) células madre o células progenitoras,

y donde la composición no comprende un disolvente aprótico dipolar, en particular DMSO.

20 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, un método de formulación de células madre o células progenitoras para la administración a un paciente comprende suspender las células en una composición según el primer aspecto de la invención. El método puede comprender además las siguientes etapas iniciales:

(a) suspender las células en una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención;

(b) almacenar la suspensión de células de la etapa (a) a una temperatura criotérmica; y

(c) descongelar la suspensión de la etapa (b).

25 La suspensión de células también se puede almacenar a una temperatura hipotérmica después de la etapa (b) o la etapa (c), es decir, la suspensión puede ser transferida de una temperatura criotérmica a una temperatura hipotérmica.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, un medicamento en una forma de dosis unitaria comprende la composición según el primer aspecto de la invención.

30 Descripción detallada de los dibujos

La presente invención se describe con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es un gráfico que muestra que la actividad metabólica de las células madre neurales formuladas en HypoThermosol®-FRS es comparable con la de las células madre formuladas en solución salina;

35 La figura 2 es un gráfico que muestra la viabilidad de células madre neurales ejemplar durante los estudios de tiempo de conservación de 5 horas entre 2°C y 8°C seguido de descongelación a temperatura ambiente durante un máximo de 4 horas;

La Figura 3 es un gráfico que muestra el almacenamiento durante la noche de células madre neurales ejemplares en HTS-FRS durante 24 horas entre 2°C y 8°C seguido de 4 horas a temperatura ambiente;

40 La figura 4 es un gráfico que muestra la viabilidad de células madre neurales ejemplar durante los estudios de tiempo de conservación de 9 días entre 2°C y 8 °C;

La Figura 5 es un gráfico que muestra la viabilidad de células madre neurales ejemplar durante los estudios de tiempo de conservación de 2 días a temperatura ambiente;

45 La figura 6 es un gráfico que muestra la viabilidad de células progenitoras de la retina durante estudios de vida útil de 24 horas entre 2°C y 8°C, en el que las células criopreservadas descongeladas se formulan en HTS-NIF sin una etapa de cultivo intermedia;

La Figura 7 es un gráfico que muestra la criopreservación de células madre neurales ejemplares durante 4 días a -80°C en medios que contienen ya sea 10% de DMSO o HTS-FRS;

La Figura 8 es un gráfico que muestra la viabilidad de las células madre neurales ejemplar inmediatamente después de la descongelación y 4 horas después de la descongelación a temperatura ambiente, en el que las células fueron crioconservadas durante un mes en vapor de nitrógeno líquido en medio que contiene o bien 10% de DMSO o bien HTS-FRS;

5 La Figura 9 es un gráfico que muestra la viabilidad de las células madre de la retina ejemplar inmediatamente después de la descongelación y 4 horas y 24 horas después de la descongelación a temperatura ambiente, en el que las células fueron crioconservadas durante un mes en vapor de nitrógeno líquido en medio que contiene o bien 10% de DMSO o bien HTS-FRS; y

10 La Figura 10 es un gráfico que muestra la viabilidad de las células madre mesenquimales ejemplar inmediatamente después de la descongelación y 4 horas después de la descongelación a temperatura ambiente, en el que las células fueron crioconservadas durante un mes en vapor de nitrógeno líquido en medio que contiene o bien 10% de DMSO o bien HTS-FRS.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a composiciones celulares y métodos de formulación de composiciones celulares adecuados para la conservación a temperaturas criotérmicas, en las que las composiciones de células conservadas se pueden administrar directamente a un paciente después de la descongelación de las células.

Tal como se utiliza en este documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, caballo, perro, gato, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono y un ser humano), y preferiblemente un ser humano.

20 La presente invención proporciona composiciones adecuadas para uso terapéutico que comprende células madre y células progenitoras en suspensión en una solución de almacenamiento hipotérmico que comprende Trolox, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano 40, adenosina y glutatión y no contiene DMSO (sulfóxido de dimetilo, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) u otros disolventes apróticos dipolares. La solución de almacenamiento hipotérmico está disponible comercialmente bajo los nombres comerciales HypoThermosol®, o  
25 HypoThermosol®-FRS (HTS-FRS) y es fabricada por BioLife Solutions, Inc. La composición de la invención es adecuada para el almacenamiento a temperaturas criotérmicas y, después de la descongelación, se puede administrar directamente a un paciente en necesidad de las células de la composición, sin necesidad de un procesamiento adicional o ensayos.

30 La clase de disolventes apróticos dipolares que están excluidos de la composición de la presente invención incluye DMSO, dimetilformamida, N-metil-2-pirrolidona y hexametilfosforamida. Los miembros de esta clase son disolventes orgánicos altamente polares que disuelven compuestos polares y no polares. Estos disolventes son miscibles en una amplia gama de disolventes orgánicos, así como en agua y tienen puntos de ebullición relativamente altos. Estos disolventes están excluidos de la composición de la invención debido a que son tóxicos para el producto celular y posteriormente para al paciente tratado.

35 La presente invención también proporciona un método para la formulación de células madre o células progenitoras para la administración clínica mediante la suspensión de dichas células en la solución de almacenamiento HTS-FRS. El método de la invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las células suspendidas en HTS-FRS en ausencia de DMSO, u otros disolventes apróticos dipolares, pueden conservarse a temperaturas criotérmicas y posteriormente se pueden administrar directamente a un paciente. Las células formuladas para la administración  
40 clínica de acuerdo con la presente invención pueden ser recuperadas a partir de un sistema de cultivo celular. Alternativamente, las células criopreservadas se pueden recuperar del almacenamiento. En consecuencia, en una realización de la invención, antes de suspender las células en HTS-FRS para la administración directa a un paciente, los siguientes pasos iniciales se llevan a cabo:

(a) las células se suspenden en HTS-FRS;

45 (b) las células en suspensión de la etapa (a) se almacenan a una temperatura criotérmica; y

(c) se descongelan las células en suspensión de la etapa (b).

Después de la crioconservación (etapa (b)) o de la descongelación (etapa (c)), la suspensión de células también puede ser almacenada a una temperatura hipotérmica.

50 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "temperatura hipotérmica" se refiere a temperaturas dentro del intervalo de 2°C a 8°C.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "temperaturas criotérmicas" se refiere a temperaturas por debajo de -20°C, preferiblemente dentro del intervalo de -70°C a -200°C, y lo más preferiblemente dentro del intervalo de -80°C a -196°C. El término "crioconservación" se refiere al almacenamiento de las células a una temperatura dentro de estos intervalos.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "temperatura ambiente" se refiere a temperaturas dentro del intervalo de 15°C a 25°C.

5 La presente invención también proporciona un medicamento en forma de dosis unitaria, que comprende células madre o células progenitoras en suspensión en HTS-FRS. El medicamento es adecuado para la administración directa a un paciente en necesidad del mismo, a través de cualquier medio de administración adecuado y, preferiblemente, a través de la implantación en el tejido o mediante administración sistémica.

10 Las células utilizadas en la invención son células madre o células progenitoras. Preferiblemente, las células son células madre somáticas humanas o células progenitoras humanas, y más preferiblemente seleccionadas de células humanas madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neurales humanas (células neuroepiteliales) y células progenitoras de la retina humanas.

Las células están presentes en la composición de la invención a una concentración en el intervalo de 20.000 a 80.000 células/ $\mu$ l, preferiblemente de 40.000 a 60.000 células/ $\mu$ l.

15 Las composiciones de células, formulaciones y medicamentos de acuerdo con la presente invención son adecuadas para la administración clínica a través de la implantación directa del tejido o por administración sistémica, incluyendo administración intraperitoneal, intravenosa, intraarterial e intramuscular. La formulación de células puede administrarse a través de cualquier método adecuado, se prefiere sin embargo la administración a través de una cánula de administración de células.

20 Las células madre o progenitoras de la composición de la invención pueden estar comprendidas en matrices biocompatibles o microvehículos. La asociación de las células con matrices o microvehículos puede promover una mejor supervivencia celular en la inyección con agujas y, después de un trasplante, una mejor integración en el tejido del huésped. Las matrices o los microvehículos son preferiblemente sustancias biodegradables poliméricas, lo más preferiblemente poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), que se describe en Bible et al. (2009). Alternativamente, las matrices o los microvehículos pueden ser matrices lisas, macroporosas o microporosas que comprenden sustancias que incluyen poli-L-lactida (PLLA), colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAG), fibrina, almidón, arabinogalactano de celulosa (goma de alerce), ácido alginico, agar, carragenina, quitina, ácido hialurónico, dextrano, goma de gelano, pululano, hidroxipatita, polihidroxialcanoatos (PHA), hidrogeles u otros materiales de auto-ensamblaje tales como matrices fibrosas nanoestructuradas peptídicas.

25 Las células madre o progenitoras pueden ser encapsuladas utilizando sustancias tales como el alginato (Tsang et al., 2007). Además, la encapsulación representa la macroencapsulación hecha por sustancias incluyendo quitosano, polietilenglicol (PEG), poli-L-lisina (PLL), poli-L-ornitina14, clorhidrato de poli(metilen-co-guanidina), Pluronic, fosfato de glicerol, ácido hialurónico, fosfato de celulosa, almidón, agarosa, carragenano, fibroína de seda, gelatina y goma gellan. Estas combinaciones de encapsulación de células pueden promover una mejor supervivencia de las células congeladas y asegurar el aislamiento físico temporal o permanente de las células madre o progenitoras y evitar cualquier potencial rechazo inmune de las células después del trasplante.

35 Las composiciones de la presente invención son adecuadas para su uso en la terapia, incluyendo el tratamiento de: (i) enfermedades neurológicas, incluyendo discapacidad crónica por accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular agudo, lesión cerebral traumática, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades relacionadas; (ii) enfermedades de la vasculatura, incluyendo isquemia periférica, enfermedad arterial periférica, infarto de miocardio, enfermedad vascular inducida por diabetes y enfermedades relacionadas; (iii) enfermedades de la retina, incluyendo retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética y enfermedades relacionadas; (iv) enfermedades autoinmunes incluyendo la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1 y las enfermedades relacionadas; y (v) los cánceres hematológicos, incluyendo leucemias, linfomas, mielomas y enfermedades relacionadas.

45 Las células formuladas de acuerdo con la presente invención no necesitan ser procesadas adicionalmente para eliminar el DMSO u otros compuestos tóxicos del medio de almacenamiento o de la preparación, ya que el producto es compatible con los dispositivos de administración de células y no es tóxico por administración clínica.

La invención se describirá ahora con referencia al siguiente ejemplo no limitativo.

#### Método

50 Formulación de células madre neuronales, células progenitoras de la retina y células madre mesenquimales

55 Se derivaron células madre neurales a partir de cerebro fetal humano y se mantuvieron en cultivo de tejidos como se describe en Pollock et al. (2006). Los cultivos de células progenitoras de la retina se obtuvieron a partir de retina fetal y fueron mantenidos en cultivos de tejido como se describe en Aftab et al. (2009). Las células madre mesenquimatosas humanas aisladas de la médula ósea retiradas de la cresta ilíaca posterior del hueso pélvico de voluntarios normales, se obtuvieron de Lonza (número de catálogo: PT-2501) y se cultivaron como se recomienda por el fabricante utilizando sus medios MSCGM (medios de crecimiento mesenquimales). Las células

proporcionadas en el paso 2 se cultivaron a través de 3 pasos utilizando tripsina/EDTA y densidades de siembra iniciales entre 5000-6000 células por cm<sup>2</sup> antes de la formulación como se describe a continuación.

5 Los cultivos de células se expandieron en matraces T hasta una confluencia de 70 a 90%. El medio gastado se aspiró y luego la monocapa de células se lavó con HBSS sin iones de magnesio o calcio (Invitrogen). El lavado se aspiró y luego las células se disociaron con tripsina bovina recombinante (Lonza TrypZean / EDTA) durante 5 minutos a 37°C. La suspensión celular disociada se mezcló con una solución de inhibidor de tripsina (0,55 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja [Sigma], 1% de HSA [Grifols], 25 U/ml de nucleasa Benzoni [VWR] en DMEM:F12 [Invitrogen]) y se centrifugó durante 5 minutos a ~ 500 x g. El sobrenadante se aspiró y se lavó el sedimento celular en HypoThermosol®-FRS al 50% (BioLife Solutions, Inc) en DMEM:F12 seguido de centrifugación a ~500 x g durante 5 minutos. Después, el sedimento celular se suspendió en HypoThermosol®-FRS a una concentración de 40.000 a 60.000 células/μL.

Las células también se descongelaron a partir del medio de criopreservación (medio de cultivo suplementado con 10% de DMSO [WAK-Chemie Medical]) en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos, luego se lavaron y se formularon en HypoThermosol®-FRS como anteriormente.

15 Las muestras de control formuladas en solución salina que contienen Trolox se lavaron en DMEM:F12 en lugar de HypoThermosol®-FRS al 50% en DMEM:F12; a continuación, en suspensión en HBSS sin iones de magnesio o calcio suplementada con 0,5 mM de N-acetil cisteína y de 0,5 a 1 μM de Trolox (Sigma).

20 Las muestras de control formuladas en solución salina fueron lavadas en DMEM:F12 en lugar de HypoThermosol®-FRS al 50% en DMEM:F12; a continuación, se suspendieron en HBSS sin iones de magnesio o calcio suplementadas con N-acetil cisteína 0,5 mM (Sigma).

Comparación de las células formuladas en HypoThermosol®-FRS y solución salina

25 La actividad metabólica de las células madre neurales formuladas en HypoThermosol®-FRS es comparable con las formuladas en solución salina. Las formulaciones de las células en HypoThermosol®-FRS o solución salina se almacenaron durante 1 hora; después se sometieron a un ensayo de la actividad metabólica (Dojindo CCK-8) durante 1 hora en cultivo. El resultado se normalizó para tener en cuenta el número de las células presentes mediante el uso de un ensayo de cuantificación de células (Invitrogen CyQUANT). Los datos muestran que las células formuladas en HypoThermosol®-FRS tienen una actividad metabólica comparable a las formuladas en solución salina (véase la Figura 1).

30 Como se muestra en la Tabla 1, las células neuronales formuladas en solución salina y HTS-FRS dan lugar a cultivos con inmunorreactividad comparable respecto a los marcadores de fenotipo. Las formulaciones de las células en HypoThermosol®-NIF o solución salina se almacenaron hasta 8 durante horas. La inmunorreactividad de nestina de las formulaciones se midió entonces usando un anticuerpo fluorescente y citometría de flujo, y la inmunorreactividad se mantuvo por encima de un límite inferior del 93% predeterminado (solución salina = 99,9%; HypoThermosol®-FRS = 99,8%). Las muestras de las células formuladas se suspendieron en medio de cultivo de expansión y se sembraron en placas de cultivo de tejidos revestidas de laminina. Ambos cultivos producen células adherentes, sanas y con apariencia normal. Estas células se analizaron a continuación por inmunocitoquímica y se midieron estando por encima de un límite predeterminado del 95% del inmunorreactivo nestina. Tras la retirada de los mitógenos durante 7 días, las células madre se diferenciaron en fenotipos neuronales con inmunorreactividad con respecto a los marcadores de fenotipo dentro de los límites predeterminados (especificidades del marcador: GFAP = astrocitos; GAIC = oligodendrocitos; DCX y TUBB3 = neuronas).

Tabla 1

	Límites predeterminados	Solución salina	HTS-FRS	Resultado
Indiferenciado	nestina ≥95%	99,7%	99,5%	paso
7d retirada de mitógenos	GFAP 6,2% -25,8%	18,4%	10,2%	paso
	GalC 8,3% -36,0%	28,2%	12,2%	paso
	DCX 3,6% -29,3%	9,0%	13,1%	paso
	TUBB3 83,8% -100%	99,3%	99,4%	paso

#### Almacenamiento hipotérmico

45 Los estudios de vida útil han evaluado la viabilidad de la línea de células madre neurales terapéuticas y de fabricación comercial CTX0E03 (Pollock et al., 2006), formulada en solución salina o utilizando el método descrito en

esta invención usando HTS-FRS. En general, las células se pueden almacenar entre 2°C y 8°C antes de la administración. Sin embargo, las condiciones de almacenamiento de las células serán a temperatura ambiente durante la administración, y este cambio de temperatura se ha tenido en cuenta durante los ensayos de vida útil. Los datos de todos los experimentos que emplean almacenamiento de 5 horas entre 2°C y 8°C, seguido por un cambio de temperatura hasta la temperatura ambiente se presentan en la Figura 2, lo que demuestra claramente el aumento en la vida útil viable ofrecida por HTS-FRS respecto a las formulaciones de solución salina. Cuando ha habido una comparación del proceso con células del mismo cultivo, el aumento medio de la viabilidad a las 7 horas otorgado por el proceso HTS- FRS respecto al proceso de HBSS + NAC es del 22,7% (viabilidad media de HBSS + NAC = 58,9%, viabilidad media de HTS -FRS = 81,6%). En cada ocasión hasta la fecha, la viabilidad de la formulación HTS-NIF de la presente invención se ha mantenido por encima del criterio de aceptación > 70%, según lo establecido por las autoridades reguladoras de los productos de células viables.

Además, se ha mostrado el almacenamiento hipotérmico durante una noche de las células CTX0E03. Las formulaciones de células independientes se mantuvieron viables durante 24 horas entre 2°C y 8°C y después de 4 horas más a temperatura ambiente para imitar las temperaturas de administración clínica (véase la Figura 3). Además, las células formuladas en HTS- FRS permanecen viables entre 2°C y 8°C durante un máximo de 7 días, en los que las células formuladas con solución salina no son viables a los 2 días (véase la Figura 4). Parte de las propiedades de conservación de las células de HTS-FRS se puede atribuir al derivado de la vitamina E, Trolox, que puede conservar las células madre neurales durante 2 días en solución salina a temperatura ambiente (véase la Figura 5). Estos datos muestran el exitoso almacenamiento a corto plazo y medio plazo de las terapias celulares en condiciones de hipotermia, siguiendo el método de esta invención.

La Figura 6 muestra la viabilidad de células progenitoras de la retina durante estudios de vida útil de 24 horas a temperaturas hipotérmicas. Las células criopreservadas descongeladas se formulan en HTS-NIF sin ningún paso de cultivo inmediato.

#### Almacenamiento criotérmico

La criopreservación de células madre neurales, células progenitoras de la retina y células madre mesenquimales se ha logrado con éxito utilizando el método de la presente invención. Las células pueden formularse de acuerdo con el método de la invención y se almacenaron a -80°C durante un máximo de 4 días, sin deterioro de la viabilidad celular (véanse las figuras 7-10). La solución no tóxica de HTS-FRS fue tan eficaz en el mantenimiento de la viabilidad de las células después de la crioconservación que se consiguió usando los métodos actuales que incorporan 10% de DMSO (véanse las figuras 8-10). Además, se ha demostrado que las células descongeladas de la invención mantienen su viabilidad después de la descongelación en HTS-FRS (véanse las figuras 8-10). Además, se ha demostrado que estas células descongeladas crecen en placas de cultivo de tejidos con la misma actividad biológica que las células criopreservadas utilizando 10% de DMSO.

#### Compatibilidad del dispositivo

Uno de los principales atributos de un excipiente aceptable para la administración de un producto de terapia celular es su compatibilidad con el aparato quirúrgico con el que será administrado en la clínica. Las diferencias en la viscosidad y la densidad de una terapia celular formulada de acuerdo con el método descrito en este documento y la solución salina, en teoría, podrían tener un impacto en la capacidad del vehículo de llevar a las células a través de la jeringa y en la administración de las células con cánulas. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 2, las células formuladas en HypoThermosol®-FRS pasan a través de una cánula de administración de células con el mismo éxito que las formuladas en solución salina. La formulación de células (50.000 células/ $\mu$ l) se introduce en una jeringa de vidrio de 250  $\mu$ l, y se expulsan 200  $\mu$ l a través de una cánula de administración de células de 19 cm a una velocidad de 1 ó 5  $\mu$ l/min. La viabilidad de las células se evaluó mediante exclusión de azul de tripán, y la concentración de las células se midió usando un hemocitómetro. Además, se midió la inmunorreactividad de nestina de las células usando un anticuerpo fluorescente y citometría de flujo. La viabilidad fue aceptable para cada formulación. La concentración de células se mantuvo constante. La inmunorreactividad de nestina se mantuvo por encima de un límite inferior del 93% predeterminado. Estos resultados corroboran además el uso de HTS-FRS como excipiente.

Tabla 2

Velocidad de eyección	Criterios pasa/no pasa	Solución salina	HTS-FRS	Resultados
5 µl/min	> 70% viables	96,4% viables	94,7% viables	paso
	de 40.000 a 60.000 células/µl	51.156 células/µl	51.778 células/µl	paso
	> 93,0% nestina+	96,6% nestina+	99,0% nestina+	paso
1 µl/min	> 70% viables	94,1% viables	93,9% viables	paso
	de 40.000 a 60.000 células/µl	51.000 células/µl	50.689 células/µl	paso
	> 93,0% nestina+	97,6% nestina+	99,2% nestina+	paso

Viabilidad celular y ensayo de concentración

5 Se mezclaron muestras de células 1:1 con azul de tripano al 0,4% (Sigma) y se cargaron en un hemocitómetro. Las células viables excluyen el tinte desde el citoplasma y son incoloras. Las células no viables que han perdido su integridad de membrana plasmática se tiñen de azul. La viabilidad y la concentración de la muestra se determinan contando las células dentro de una cuadrícula del hemocitómetro usando microscopía de contraste de fase con un objetivo 10 x.

10 La formulación de las células madre humanas y de las células progenitoras de acuerdo con la presente invención prolonga la vida de almacenamiento viable del producto de la técnica anterior de aproximadamente 3 horas a al menos 24 horas cuando se almacena a entre 2°C y 8°C. Además, las células pueden tolerar la criopreservación en este mismo medio de almacenamiento a temperaturas menores de -70°C durante más de 4 días y en condiciones de almacenamiento de nitrógeno líquido (~-195°C) durante al menos 6 meses. Estas mejoras en el tiempo de conservación no tienen un impacto sobre las características del producto almacenado, lo que potencia que no les afecte.

Toxicidad

20 No se alteró la toxicidad de las terapias celulares formuladas de acuerdo con el método de esta invención. Cuando se implantaron en ratones no hubo ninguna toxicidad manifiesta asociada ya sea con el vehículo HypoThermosol®-FRS o en la combinación con las células madre neurales. Estos estudios han incluido la administración intracraneal e intramuscular. Además, se ha completado un estudio de toxicidad en ratas, que no mostró diferencias entre la respuesta del sujeto frente a la administración intracraneal de la solución de HypoThermosol®-FRS o la solución salina y ninguna reacción evidente para cualquiera de las soluciones.

Referencias

25 Aftab U, Jiang C, Tucker B, Kim J-Y, Klassen H, Miljan E, Sinden J, Young M (2009) Growth kinetics and transplantation of human retinal progenitor cells. *Experimental Eye Research* 89; 301-310.

Bible E, Chau, YS, Alexander MR, Price J, Shakesheff KR, Modo M. (2009) The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles. *Biomaterials* 30: 2985-2994.

30 Calmels B, Houze P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C (2003) Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant* 31:823-828.

Hubel A (2001) Cryopreservation of HPCs for clinical use. *Transfusion* 41:579-580.

Ikonomovic M, Kelly KM, Hentosz TM, Shih SR, Armstrong DM, Taylor MJ (2001) Ultraprofound cerebral hypothermia and blood substitution with an acellular synthetic solution maintains neuronal viability in rat hippocampus. *Cryo Letters* 22:19-26.

35 Pollock K, Stroemer P, Patel, Stevanato L, Hope A, Miljan E, Dong Z, Hodges H, Price J, Sinden JD (2006) A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol*. 199(1):143-55.

Sauer-Heilbom A, Kadidlo D, McCullough J (2004) Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 44:907-916.

Storey BT1 Noiles EE, Thompson KA (1998) Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37:46-58.

Syme R, Bewick M, Stewart D, Porter K, Chadderton T, Gluck S (2004) The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:135- 141.

5 Taylor MJ, Bailes JE, Elrifai AM, Shih SR, Teeple E, Leavitt ML, Baust JG, Maroon JC (1995) A new solution for life without blood. Asanguineous low- flow perfusion of a whole-body perfusate during 3 hours of cardiac arrest and profound hypothermia. *Circulation* 91:431-444.

10 Tsang, Wen-Ghih; Zheng, Tianli; Wang, Yanping; Tang, Jinghua; Rind, Howard B.; Francki, Aleksander; Bufius, Nataliya (2007) Generation of Functional Islet-Like Clusters After Monolayer Culture and Intracapsular Aggregation of Adult Human Pancreatic Islet Tissue. *Transplantation* 83(6):685-693.

Williams SK, Senechal G (2001) Safety of Hypothermosol for Intra-Cardiac Injection. In. Tuscon, AZ, USA: University of Arizona Health Sciences Center.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para uso en terapia que comprende:
- i) Trolox, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano 40, adenosina y glutatión; y
  - 5 ii) células madre neurales humanas o mesenquimales,
- en la que la composición no incluye un disolvente aprótico dipolar, en particular DMSO, y en la que la composición es adecuada para el almacenamiento a temperaturas criogénicas y, después de descongelar, es adecuada para la administración directa a un paciente sin requerir adicionales procesamientos.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células están comprendidas en una matriz polimérica o micro-portadora, preferiblemente, en la que la matriz polimérica o el microvehículo es PLGA.
3. Un método de formulación de células madre neurales humanas o mesenquimales o células progenitoras retinales humanas para la administración directa a un paciente que comprende suspender las células en una composición de acuerdo con la reivindicación 1(i), preferiblemente, en la que las células se recuperan de un sistema de cultivo celular.
- 15 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el método comprende las siguientes etapas iniciales:
- (a) suspender las células en una composición de acuerdo con la reivindicación 1 (i);
  - (b) almacenar la suspensión de células de la etapa (a) a una temperatura criotérmica; y
  - (c) descongelar la suspensión de la etapa (b).
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura entre -70°C y -200°C, y preferiblemente entre -80°C y -196°C.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la suspensión celular se almacena a una temperatura hipotérmica después de la etapa (b) o la etapa (c), preferiblemente, en el que el almacenamiento hipotérmico se lleva a cabo a una temperatura entre 2°C y 8°C.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que las células están comprendidas en una matriz polimérica o micro-portadora, preferiblemente, en la que la matriz polimérica o el microvehículo es PLGA.
- 25 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que las células están encapsuladas.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las células se encapsulan en una sustancia seleccionada a partir de alginato, quitosano, PEG, PLL, poli-L-ornitina<sup>14</sup>, clorhidrato de poli(metilen-co-guanidina), Pluronic, fosfato de glicerol, ácido hialurónico, fosfato de celulosa, almidón, agarosa, carragenano, fibroína de seda, gelatina y goma gellan.
- 30 10. Un medicamento en una forma de dosis unitaria que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
11. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el medicamento se administra directamente a un paciente en necesidad del mismo a través de la implantación en tejidos o la administración sistémica.

35

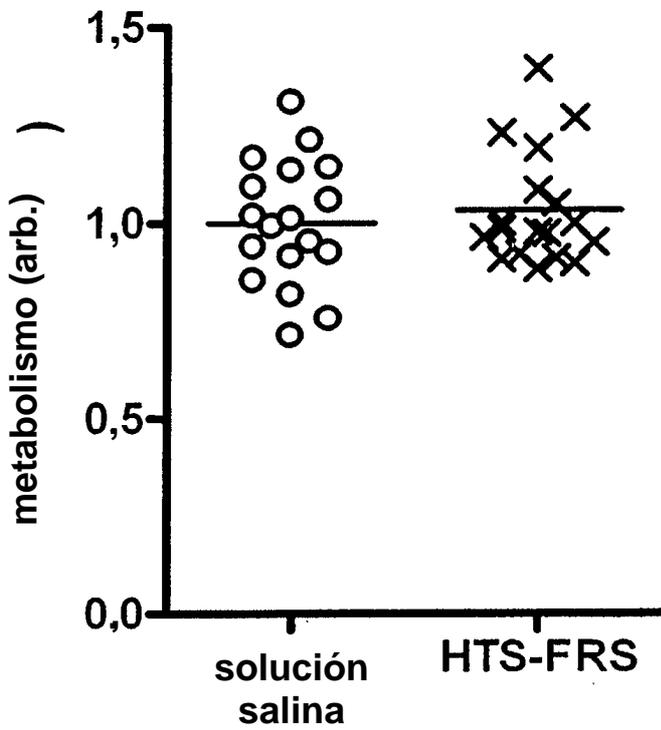


Figura 1

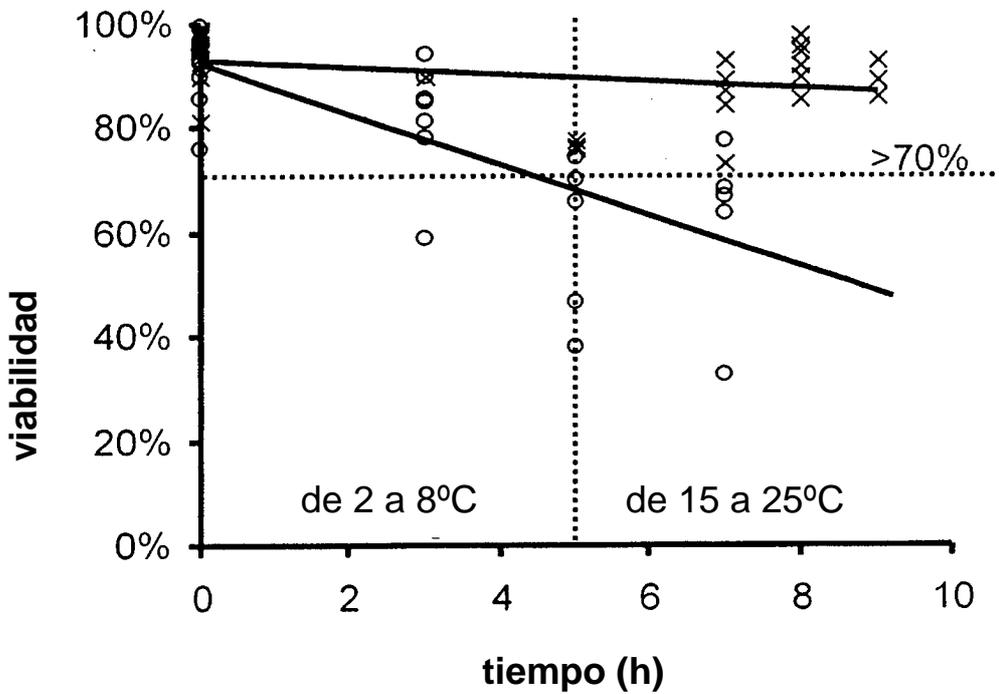


Figura 2

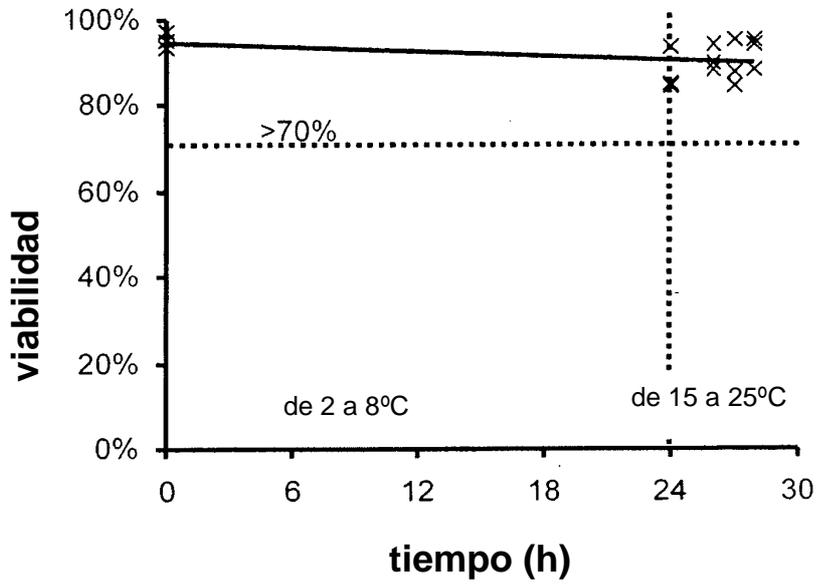


Figura 3

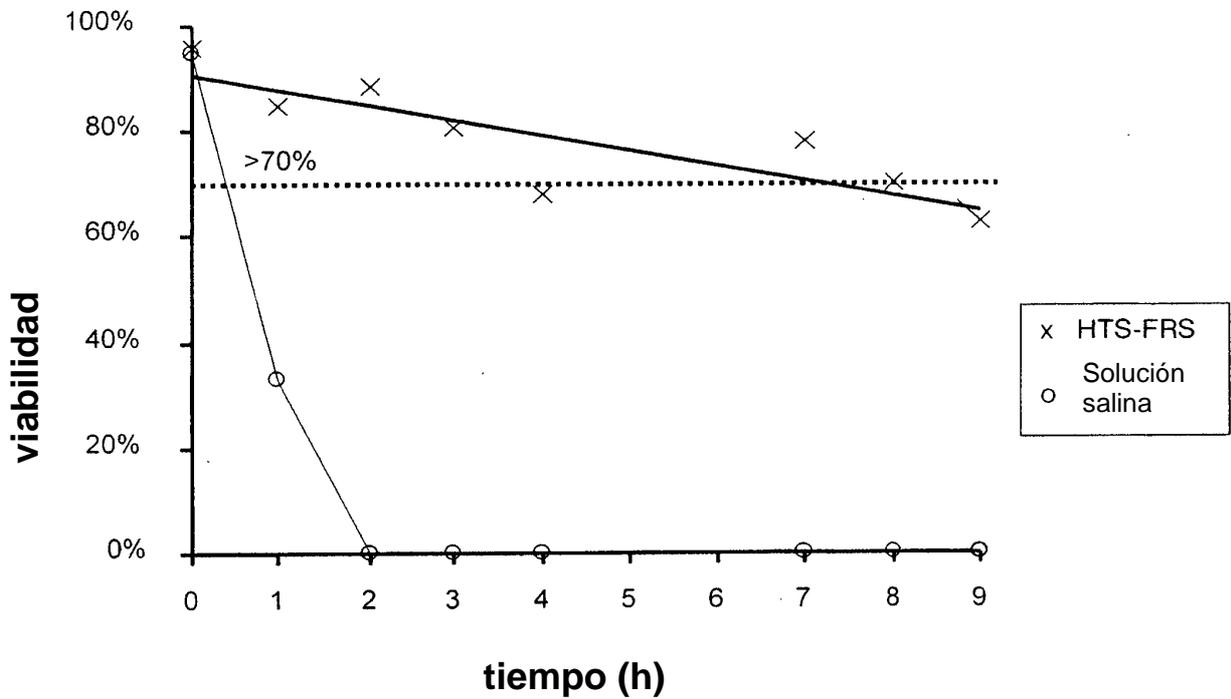


Figura 4

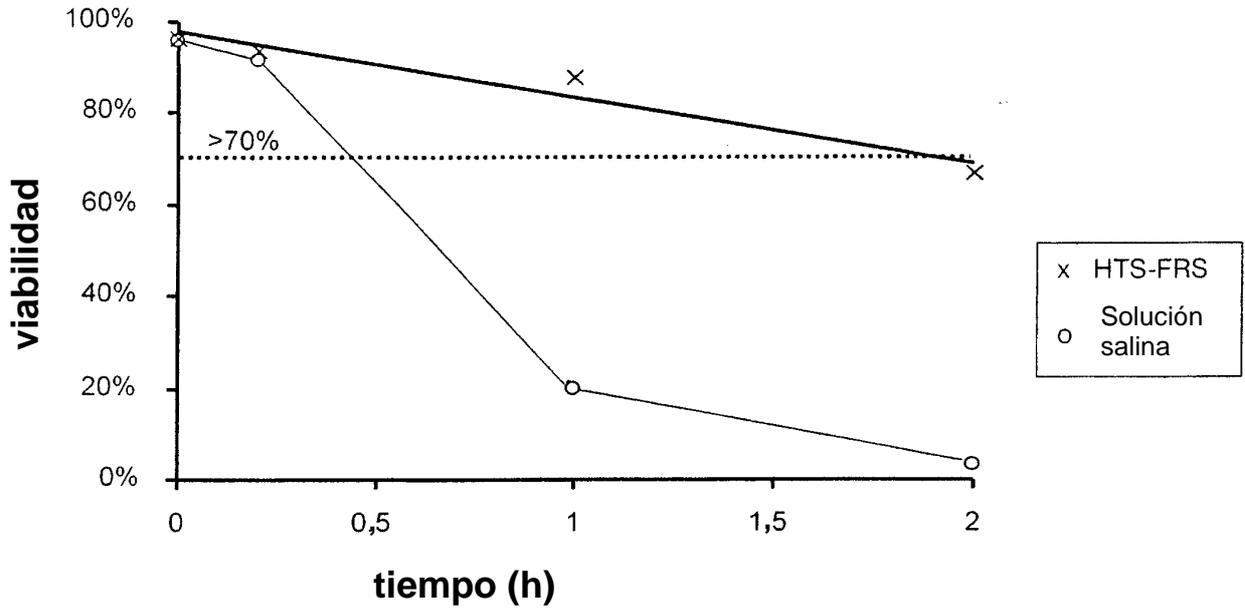


Figura 5

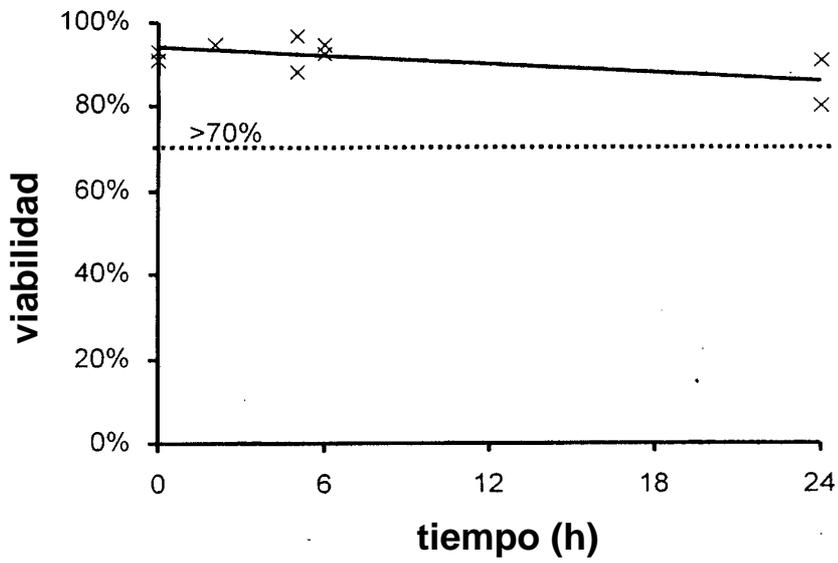


Figura 6

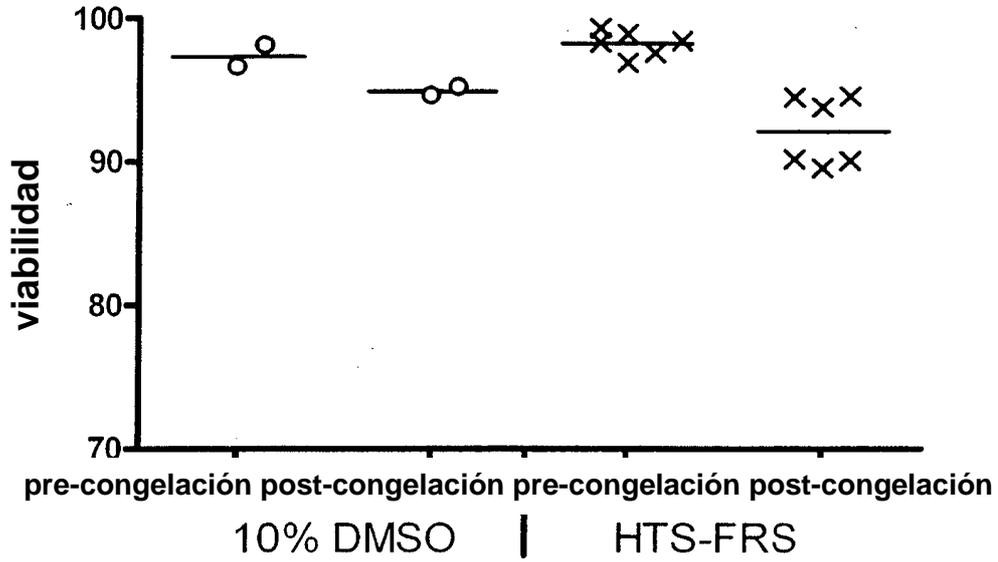


Figura 7

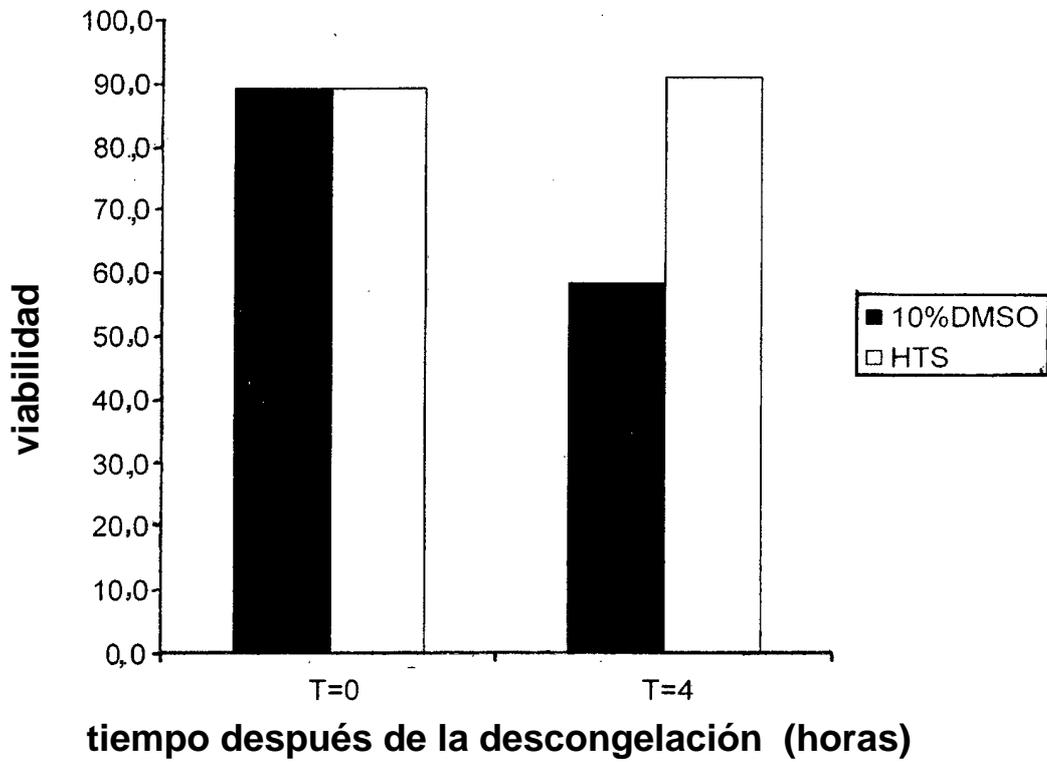


Figura 8

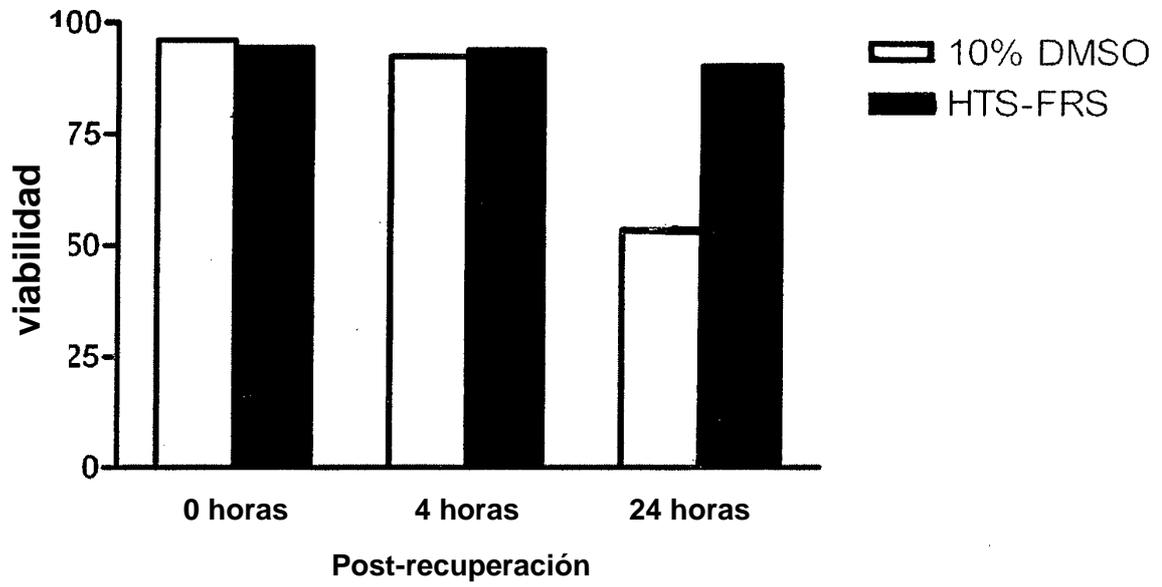


Figura 9

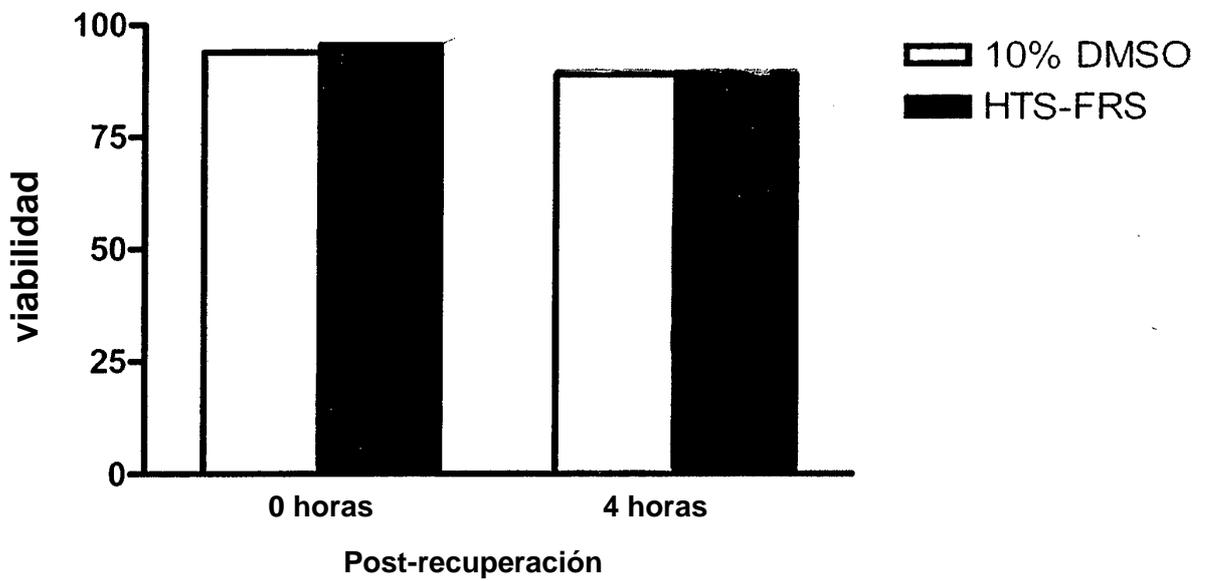


Figura 10