

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 974**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2009 PCT/US2009/053891**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10019886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2009 E 09807366 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2318519**

54 Título: **Composiciones de células madre mesenquimales purificadas**

30 Prioridad:

14.08.2008 US 88898 P

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

17.04.2017

73 Titular/es:

**MESOBLAST INTERNATIONAL SÀRL (100.0%)
Route de Pre-Bois 20
1217 Meyrin, CH**

72 Inventor/es:

**DANILKOVICH, ALLA;
NEWMAN, ROBERT, E.;
TOM, SAMSON;
TON, CHRISTOPHER;
WANG, ZHANLING y
YOUNG, RANDAL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 974 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 de células madre mesenquimales purificadas

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos con número de serie 61/088.898, presentada el 14 de agosto de 2008.

Investigación o desarrollo patrocinado por el gobierno federal

[No aplica]

[Referencia de microficha / derechos de autor]

[No aplicable]

10 Antecedentes de la invención

15 Las células madre mesenquimales ("MSC") pueden encontrarse en la médula ósea, la sangre, la dermis, el periostio y otros tejidos del cuerpo, y son capaces de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, incluyendo adiposo, areolar, óseo, cartilaginoso, elástico, estroma de la médula, músculo, tejido conectivo fibroso y tejido cardíaco, dependiendo de diversos factores e influencias *in vivo* o *in vitro*. Dichas células se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos.: 5.197.985, 5.226.914, 5.486.359, 5.837.539 y 6.087.113.

Se ha demostrado que las MSC se colocan en otro sitio y se diferencian selectivamente, con base en el entorno del tejido, en linajes tales como músculo, hueso, cartílago, estroma de la médula, tendón y grasa. Debido a su origen celular y al fenotipo, estas células no provocan una respuesta inmune adversa, permitiendo el desarrollo de productos derivados de donantes humanos no relacionados.

20 En general, las MSC se aíslan del tejido del que se obtienen, se purifican y luego se expanden en un medio de cultivo apropiado. El medio de cultivo contiene una variedad de componentes que soportan la expansión de las MSC, tal como el suero, que comprende proteínas del suero (por ejemplo, albúmina de suero, tal como albúmina de suero bovino); factores de crecimiento; y citoquinas. Después del aislamiento, purificación y expansión del cultivo, las MSC se someten a una serie de lavados y, opcionalmente, centrifugación. Las MSC pueden entonces congelarse y almacenarse en un medio de crioconservación apropiado, por ejemplo un medio de crioconservación que comprende dimetilsulfóxido ("DMSO"). Posteriormente, las MSC se descongelan justo antes de la administración a un paciente.

25 El procedimiento de fabricación para la expansión de las MSC implica el cultivo celular en presencia de suero no autólogo y la recolección de las células por tripsina no autóloga; en algunos procesos, el suero no autólogo es el suero fetal bovino ("FBS") y la tripsina no autóloga es la tripsina porcina. La expansión *ex vivo* de MSC humanas ("hMSC") usando reactivos animales conduce a la presencia de macromoléculas residuales de origen no humano (por ejemplo, macromoléculas de origen porcino y bovino) en el producto final. Después de expandir las hMSC en medios que comprenden productos no humanos, se puede observar una mayor cantidad de sustancias xenogénicas con relación a las hMSC expandidas en medios que comprenden productos humanos.

30 La albúmina de suero bovino ("BSA") es un componente significativo del FBS. Tanto la BSA como la tripsina porcina son alérgenos conocidos. Por lo tanto, pueden desencadenar reacciones adversas en pacientes susceptibles a macromoléculas de bovino y de porcino, y pueden causar la sensibilización no alérgica del paciente que conduce a reacciones alérgicas tras exposiciones múltiples (véase, por ejemplo, Colten HR y colaboradores, N Engl J Med. 1975, 292: 1050, Moneret-Vautrin A. y colaboradores, Allergy, 1991, 46: 228, Orta M y colaboradores, Ann Allergy Asthma Immunol 2003, 90: 446, de Benito V. y colaboradores, Allergologia et Immunopathologia, 2001, 29: 272). Las mayores cantidades de FBS presentes en las MSC expandidas en cultivo también pueden inducir efectos secundarios no deseados en pacientes, tales como respuestas inmunes indeseables, embolismo pulmonar, vasoconstricción, shock cardíaco o muerte. La presencia de BSA residual o tripsina porcina puede aumentar la inmunogenicidad y acelerar el despeje o eliminación de las MSC del receptor. Las mayores cantidades de FBS presentes en composiciones farmacéuticas que comprenden MSC expandidas en cultivo pueden aumentar el riesgo de transmisión de virus, enfermedades priónicas y proteínas xenogénicas a pacientes que reciben tales terapias basadas en MSC. Las mayores cantidades de FBS, particularmente de BSA, presentes en composiciones farmacéuticas que comprenden las hMSC expandidas en cultivo pueden iniciar respuestas inmunes contra estas sustancias xenogénicas. Por ejemplo, si la preparación de MSC administrada a un paciente contiene BSA u otras proteínas xenogénicas, dichas proteínas xenogénicas pueden desencadenar una respuesta inmune indeseable. Las proteínas xenogénicas pueden provocar respuestas inmunitarias mediadas por células o humorales (por ejemplo, la generación de anticuerpos anti-proteína de suero bovino), lo que puede dar lugar a un injerto menos eficiente de las MSC, en particular si tales proteínas

xenogénicas se asocian con las membranas de superficie celular MSC. Por lo tanto, se necesita un nuevo enfoque para reducir la cantidad de sustancias xenogénicas, incluyendo FBS, y particularmente BSA, presentes en composiciones farmacéuticas que comprenden MSC expandidas en cultivo. Se necesita un nuevo enfoque para reducir la cantidad de sustancias xenogénicas, incluyendo azúcares, proteínas y otras macromoléculas presentes en las MSC expandidas en cultivo, lo que podría aumentar el perfil de seguridad de la composición farmacéutica de MSC resultante.

Se han propuesto medios que comprenden sueros alternativos tales como suero humano autólogo, sin embargo, el uso de suero autólogo no es posible cuando las cantidades de células requeridas en el producto de MSC final exceden a las que pueden crecer en una cantidad fija de suero autólogo. Además, el uso de suero humano autólogo presupone que el paciente dispondrá de tiempo suficiente y será suficiente saludable para donar suero antes del inicio de la terapia con MSC. El procedimiento actual de cultivo convencional de MSC requiere típicamente de 2 a 10 semanas para aislar, expandir, recoger y purificar un número adecuado de células para constituir un tratamiento farmacéutico. En algunos casos, un tratamiento farmacéutico consiste en una dosis. En otros casos, un tratamiento farmacéutico consiste en dos o más dosis. Desafortunadamente, en algunos casos, se requiere de la terapia con MSC aproximadamente menos de dos semanas desde el diagnóstico o presentación de los síntomas clínicos, o aproximadamente menos de una semana desde el diagnóstico o presentación de síntomas clínicos. Cuando se requiere de la terapia con MSC dentro de un período corto tiempo desde el diagnóstico o la presentación de los síntomas clínicos, las hMSC que ya han sido fabricadas, purificados y criopreservadas muestran el beneficio significativo de estar disponibles después del diagnóstico o presentación de una enfermedad aguda.

Además, el suero humano, incluyendo suero humano autólogo, presenta un aumento estadísticamente significativo en el riesgo de transmitir una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad viral, al receptor de la composición farmacéutica de MSC.

Spees y colaboradores, mencionan combinaciones de medios que comprenden pasajes en serie en suero fetal de ternera ("FCS") y suero humano autólogo. (Spees y colaboradores, *Mol Therapy*, 2004, 9: 747). Las composiciones finales producidas por combinaciones en serie de medios produjeron un intervalo mayor de 15 veces en FCS residual por muestra de acuerdo con la electroforesis de SDS-PAGE de FCS marcado después de 50 ciclos de lavado. Los protocolos que requieren suero humano autólogo y lavado extensivo que no proporcionan composiciones finales más reproducibles son académicamente interesantes, pero no proporcionan la calidad o consistencia requerida para fabricar una composición farmacéutica adecuada para administración a un ser humano.

Se han establecido dosis de riesgo y umbrales para la reactividad clínica entre pacientes alérgicos para una serie de antígenos. (Moneret-Vautrin A. y Kanny G., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 2004, 4: 215, Bindsvlev-Jensen C y colaboradores, *Allergy*, 2002, 57: 741). Aunque estos umbrales se establecen para administración oral de antígenos, los umbrales para exposición intravenosa ("IV") a los alérgenos son desconocidos. (Wensing M. y col., *J Allergy Clin Immunol.*, 2002, 110: 915, Taylor SL y col., *Clin Exp Allergy*, 2004, 34: 689). Las decisiones terapéuticas con respecto a la administración intravenosa de composiciones que comprenden las MSC se complican por la ausencia de datos de umbral y reportes en la literatura que demuestran que productos celulares y derivados de animales pueden causar reacciones adversas graves (por ejemplo, anafilaxis y enfermedad similar a la enfermedad del suero). (Moneret-Vautrin A y colaboradores, *Allergy*, 1991, 46: 228, Orta M y colaboradores, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003, 90: 446, de Benito V. y colaboradores, *Allergologia et Immunopathology*, 2001, 29: 272.

Como ejemplo, se establecen dosis de riesgo y umbrales para la reactividad clínica entre pacientes alérgicos para una serie de antígenos, la mayoría de los cuales se refieren a categorías de alérgenos alimentarios (Moneret-Vautrin A. y Kanny G., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004, 4:21). Debido a que estos umbrales se establecieron para la administración oral de antígenos, se espera que sean diferentes de los umbrales para la administración intravenosa. Una vez más, los umbrales para la exposición IV a los alérgenos siguen siendo desconocidos. (Taylor SL y colaboradores, *Clin Exp Allergy*, 2004, 34: 689). La ausencia de datos de umbral y reportes en la literatura demuestra que los productos celulares y derivados de animales pueden causar reacciones adversas graves (por ejemplo, anafilaxia y una enfermedad similar a la enfermedad del suero) excluido el uso de productos terapéuticos fabricados en presencia de productos bovinos o porcinos. (Orta M. y colaboradores, *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003, 90: 446).

Perotti y colaboradores mencionan la filtración centrífuga como una técnica útil para eliminar el DMSO crioconservado de la sangre del cordón umbilical. (Perotti CG y colaboradores, *Transfusion*, 2004, 44 (6): 900 - 906). Calmels y colaboradores mencionan la filtración centrífuga como una técnica útil para eliminar el DMSO de los injertos de células hematopoyéticas. (Calmels B y colaboradores, *Bone Marrow Transplant.*, 2003, 31 (9): 823-828). Hampson y colaboradores mencionan métodos para lavar las células mononucleares cultivadas de médula ósea. (Documento US 2008/0175825). Se reportó que los niveles residuales de BSA después del lavado del sobrenadante del cultivo celular eran aproximadamente de menos de 3 µg/mL. Utilizando un instrumento Cytomate para lavar células mononucleares de médula ósea, Hampson y colaboradores obtuvieron aproximadamente 70% de viabilidad celular después del lavado. Hampson y colaboradores indicaron que esta caída significativa en la viabilidad celular puede haber sido debida a daño celular causado por fuerzas mecánicas aplicadas durante el proceso.

Los protocolos que requieren un lavado extensivo de células no proporcionan la calidad o consistencia requeridas para fabricar una composición farmacéutica adecuada para administración a un ser humano. Además, se desconocen los efectos de los protocolos de lavado extensivos sobre la viabilidad de las células y la eficacia de una composición farmacéutica que comprende dichas células.

5 Además, muchos protocolos de purificación publicados comprenden al menos una etapa que implica la transferencia del producto intermedio que contiene MSC donde el producto se expone al entorno externo (es decir, no es un sistema cerrado). A medida que los sistemas cerrados controlan cuidadosamente la cantidad y calidad de los materiales que entran y salen del sistema, así como la forma mediante la cual entran o salen estos materiales, el desarrollo de un sistema de fabricación cerrado para la preparación de composiciones farmacéuticas de MSC representaría un logro significativo en la técnica.

10 Con estos desafíos en mente, es necesario: 1) establecer una dosis de umbral para componentes residuales en el producto que minimice el riesgo de reacciones alérgicas en pacientes; 2) proporcionar un método para purificar una composición de hMSC para reducir la cantidad de componentes residuales, incluyendo alérgenos, por debajo del nivel de umbral, minimizando al mismo tiempo el daño celular y manteniendo la viabilidad celular; y 3) proporcionar una composición de hMSC que comprende menos de la cantidad de umbral de componentes residuales, incluyendo alérgenos, daño celular limitado y una alta proporción de células viables.

15 En resumen, el estado de la técnica relacionado con los métodos de preparación de composiciones farmacéuticas de MSC requiere de mucho tiempo: reducir la inmunogenicidad de composiciones de MSC cultivadas en suero no humano. Además, la presente tecnología descrita y reivindicada en la presente memoria sorprendentemente identificó un desafío que no se había reconocido previamente en la técnica convencional como una deficiencia significativa: la reducción del nivel de agregación de MSC.

Breve descripción de la invención

25 El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Algunas realizaciones de la presente tecnología descrita en la presente memoria divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC que tienen inmunogenicidad reducida con respecto a las composiciones de MSC por purificación.

Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC que exhiben una D_{90} reducida de cualquiera de los agregados de MSC presentes en la composición farmacéutica.

Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC que exhiben una menor adhesión de MSC individuales entre sí.

30 Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC en donde las MSC se purifican por filtración centrífuga después de la expansión del cultivo

35 Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC purificadas por filtración centrífuga que simultáneamente (i) reducen la inmunogenicidad de composiciones de MSC; y, (ii) reducen el tamaño promedio de los agregados de MSC disminuyendo las propiedades adhesivas de las MSC individuales.

40 Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC purificadas con una inmunogenicidad reducida y una tendencia reducida a agregarse. Otras realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC purificadas por filtración centrífuga. El procedimiento simultáneamente (i) reduce la inmunogenicidad de composiciones de MSC; y, (ii) reduce el tamaño promedio de los agregados de MSC.

Algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC y DMSO.

45 Además, algunas realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC que han sido purificadas para reducir la cantidad de sustancias xenogénicas tales como proteínas presentes después de la expansión en medio de cultivo que comprende, por ejemplo, BSA. Dichas composiciones farmacéuticas exhiben perfiles de seguridad superiores a través, por ejemplo, de la reducción de la inmunogenicidad de tales composiciones.

50 Otras realizaciones de la presente tecnología divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden MSC que han sido purificadas para reducir la cantidad de sustancias que incluyen moléculas de la membrana de la superficie celular, ácidos nucleicos extracelulares (ADN/ARN) y otros residuos celulares. Dichas composiciones farmacéuticas pueden presentar perfiles de seguridad superiores mediante la disminución del tamaño promedio de los agregados de MSC, por ejemplo, por reducción de las propiedades adhesivas de las MSC individuales. Tal reducción en las propiedades adhesivas puede producir una disminución en el tamaño promedio de los agregados de MSC.

Además, algunas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones que comprenden hMSC expandidas en cultivo que tienen cantidades reducidas de componentes de FBS residuales, particularmente BSA, con relación a un lote comparable de MSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas de estas realizaciones, la cantidad de BSA en las composiciones que comprenden las MSC expandidas en cultivo después de la purificación es de aproximadamente 10 a 1.000 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable de MSC no purificadas, expandidas en cultivo.

Otras realizaciones adicionales de la presente tecnología se refieren a células madre mesenquimales humanas purificadas, y a métodos de purificación de células madre mesenquimales humanas. Más particularmente, ciertas realizaciones se refieren a composiciones farmacéuticas que incluyen hMSC en donde la cantidad de moléculas extracelulares de superficie celular y transmembrana en dichas composiciones se reduce en 1 log (tal como se utiliza en la presente memoria, el término "log" se refiere a log en base 10) con relación a un lote comparable de hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. Otras realizaciones se refieren a una o más composiciones farmacéuticas que comprenden aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual. Algunas realizaciones de esta tecnología se refieren a una composición farmacéutica que comprende MSC que exhiben un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm.

En realizaciones adicionales, la presente tecnología se refiere a métodos para fabricar composiciones farmacéuticas que comprenden hMSC expandidas en cultivo en donde la cantidad de moléculas extracelulares de superficie celular y transmembrana en dichas composiciones se reduce en 1 log con relación a un lote comparable de hMSC no purificadas, en cultivo expandido. Otras realizaciones se refieren a un método de fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden hMSC expandidas en cultivo que comprenden aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual. Otras realizaciones se refieren a un método de fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden hMSC expandidas en cultivo que comprenden hMSC que exhiben un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm. Algunas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones farmacéuticas de MSC, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm.

Otras realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones que comprenden hMSC expandidas en cultivo que tienen cantidades reducidas de sustancias xenogénicas, incluyendo azúcares, proteínas y otras macromoléculas con respecto a un lote comparable de MSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas en las composiciones que comprenden las MSC expandidas en cultivo después de la purificación es aproximadamente 1 log menor que la cantidad presente en un lote comparable de MSC no purificadas, expandidas en cultivo.

En otras realizaciones adicionales, la presente tecnología se refiere al establecimiento de una cantidad de umbral de componentes residuales en un producto de hMSC que minimizará el riesgo de reacciones alérgicas en pacientes, particularmente en pacientes que reciben dicho producto por una vía IV.

Además, en algunas realizaciones, la presente tecnología se refiere a métodos para purificar hMSC en los que se purifica una preparación de hMSC poniendo en contacto la preparación con una solución de lavado, agitando la preparación y recuperando las hMSC purificadas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un ejemplo de un aparato que se puede usar para lavar y purificar células madre mesenquimales de acuerdo con una realización de la presente tecnología.

La Figura 2 es una fotografía (aumento 10x) de una composición no purificada de MSC.

La Figura 3 es una fotografía (aumento 10x) de una composición de MSC purificada por centrifugación.

La Figura 4 es una fotografía (aumento 10x) de una composición de MSC purificada por filtración centrífuga.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones anexas. Algunas realizaciones de la presente tecnología descritas en la presente memoria resuelven el desafío previamente reconocido de proporcionar una composición farmacéutica de MSC que tiene cantidades reducidas de sustancias xenogénicas. Algunas realizaciones de la presente tecnología también identifican y resuelven el desafío hasta ahora no reconocido de proporcionar una composición farmacéutica de MSC que tiene una tendencia reducida a la agregación. Individual y colectivamente, estas dos soluciones proporcionan composiciones farmacéuticas de MSC, particularmente composiciones farmacéuticas de hMSC, que exhiben una eficacia terapéutica mejorada y perfiles de seguridad superiores.

En al menos un aspecto, la tecnología actualmente descrita proporciona una composición que comprende MSC purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual. En otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 15 µg/mL de BSA residual. En aún otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende MSC purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 50 µg/mL de BSA residual; alternativamente, aproximadamente menos de 45 µg/mL de BSA residual; alternativamente, aproximadamente menos de 40 µg/mL de BSA residual; alternativamente, aproximadamente menos de 35 µg/mL de BSA residual; alternativamente, aproximadamente menos de 30 µg/mL de BSA residual; alternativamente, aproximadamente menos de 25 µg/mL de BSA residual; Alternativamente, aproximadamente menos de 20 µg/mL de BSA residual; o alternativamente, aproximadamente menos de 15 µg/mL de BSA residual. La BSA residual resultante de los métodos publicados generalmente se reporta como aproximadamente 30-700 µg de BSA por 1×10^6 células (Spees y colaboradores, Mol Therapy, 2004, 9: 747). Como se ilustra mediante los Ejemplos a continuación, la reducción de más de 200 veces en BSA entre las composiciones publicadas y los métodos relativos a la presente tecnología representan un aumento significativo y sorprendentemente inesperado en el margen de seguridad de las composiciones farmacéuticas de MSC.

Durante la incubación de MSC en un medio que contiene BSA, la BSA puede asociarse con la superficie de la célula de MSC. Con el fin de evaluar con precisión los niveles de BSA total después de la incubación de las MSC en medios de cultivo celular suplementados con BSA, es necesario obtener una medición que explique la BSA en el sobrenadante, así como BSA que se ha asociado con las MSC. Por ejemplo, las células en una alícuota de la suspensión pueden lisarse antes de medir los niveles de BSA. De esta manera, se pueden obtener los niveles de BSA total, que comprende tanto BSA libre como BSA asociada a células.

También, algunas realizaciones de la presente tecnología proporcionan una composición que comprende MSC purificadas, en donde las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En algunas realizaciones, las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm. En algunas realizaciones, las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 25 µm. En algunas realizaciones, las MSC presentan un D_{90} aproximadamente menor a 30 µm; alternativamente, aproximadamente menor a 25 µm; o alternativamente, aproximadamente menor a 20 µm.

Algunas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones farmacéuticas de MSC, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En otras realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En aún otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 15 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan una D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En aún otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual y las MSC presentan una D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm. En algunas realizaciones, las MSC presentan una D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm y la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones, las MSC presentan una D_{90} entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 25 µm y la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de BSA residual. Algunas realizaciones de la presente tecnología proporcionan una composición que comprende MSC purificadas, en donde las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm y la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual. En algunas realizaciones, las MSC presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 25 µm y la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "agregado" significa el total de una pluralidad de células individuales juntas en un clúster agrupado por una o más propiedades adhesivas que incluyen agregación, aglomeración y aglutinación. Tal como se usa en el presente documento, "agregación" significa la tendencia de las células a agregarse. Originalmente se planteó la hipótesis, y más tarde se evidenció mediante experimentos detallados en la sección de Ejemplos de esta solicitud de patente, que las poblaciones purificadas de MSC exhiben una tendencia reducida a formar agregados. Sin

estar limitado por la teoría, se cree que estos agregados de MSC no se dispersan eficientemente después de la administración y son de tamaño suficiente para potencialmente causar embolias pulmonares mortales.

5 La presente tecnología reconoció por primera vez que la formación de un agregado que comprende MSC puede conducir a embolias pulmonares. Un aumento en las cantidades de sustancias xenogénicas puede causar, entre otras cosas, una mayor adhesión celular presumiblemente debido a ciertas sustancias xenogénicas que interactúan con azúcares, proteínas u otras macromoléculas unidas a la membrana. Además, las prácticas actuales de fabricación de hMSC dan como resultado mayor cantidad de sustancias en la superficie de la célula, incluyendo azúcares, proteínas y otras macromoléculas (por ejemplo CD 105 y CD 166), presentes en las composiciones recogidas de hMSC. Ciertas macromoléculas, ya sean endógenas o exógenas, aumentan las características de adhesión de las MSC. A medida que 10 las MSC se vuelven más adhesivas, exhiben una mayor tendencia a agregarse entre sí. Tales agregados pueden potencialmente aumentar el riesgo de embolismo pulmonar en receptores de composiciones farmacéuticas de hMSC. Por ejemplo, se cree que la BSA es capaz de formar una asociación no covalente con la membrana celular de MSC aumentando tanto la inmunogenicidad como las propiedades adhesivas de las MSC. Por lo tanto, la presente tecnología identificó y resolvió un problema previamente no reconocido al proporcionar composiciones de MSC con una tendencia 15 reducida a agregarse.

Por lo tanto, se prefieren las técnicas que procesan células mediante selección simultánea de masa y tamaño, tal como filtración centrífuga, a las técnicas que seleccionan en serie la masa, y luego el tamaño, o viceversa. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 100 μm . Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 50 μm . De hecho, algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición no comprende agregados de células madre mesenquimales detectables. 20 25

Algunas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones farmacéuticas de MSC, en donde la composición comprende aproximadamente 55 $\mu\text{g/mL}$ de BSA residual y en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . En otras realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende aproximadamente menos de 42 $\mu\text{g/mL}$ de BSA residual y la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . En aún otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 25 $\mu\text{g/mL}$ de BSA residual y la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 13 $\mu\text{g/mL}$ de BSA residual y la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 10 $\mu\text{g/mL}$ de BSA residual y la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm . 30 35 40

Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 1000 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 750 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 500 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 200 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 100 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 50 MSC. Algunas realizaciones de la presente tecnología comprenden una composición farmacéutica de MSC que consiste en una pluralidad de MSC en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales en donde ningún agregado comprende más de 10 MSC. 45 50 55

Después de un período de incubación de hMSC en medio de cultivo, pueden estar presentes un cierto número de moléculas en el medio de cultivo, incluyendo moléculas extracelulares y asociadas a la membrana celular. Por ejemplo, 60

tales moléculas pueden incluir sustancias xenogénicas, tales como BSA y otras moléculas de origen no humano. Adicionalmente, las sustancias producidas por las propias hMSC pueden estar presentes en el medio de cultivo después de un período de incubación. Por ejemplo, tales moléculas pueden incluir proteínas secretadas tales como citoquinas y factores de crecimiento así como moléculas expresadas en la superficie celular de las hMSC. Puede ser deseable purificar las hMSC tras un período de incubación en medio de cultivo para remover las moléculas presentes en el medio de cultivo, incluyendo moléculas extracelulares y asociadas a la membrana celular. Dicha purificación puede reducir o impedir la tendencia de las hMSC a agregarse, reducir el tamaño de cualquier agregado de hMSC formado o inhibir completamente la formación de agregados de hMSC.

Sin estar limitado por la teoría, no es deseable purificar las MSC más allá de los umbrales mínimos de seguridad descritos en la presente memoria, ya que una purificación adicional puede disminuir la cantidad de moléculas de adhesión, tales como integrinas, que se expresan en la superficie de la células MSC. Tales moléculas de adhesión son necesarias para que las MSC ejerzan su efecto terapéutico. Las MSC excesivamente purificadas carecen de la cantidad de moléculas de adhesión necesarias para adherirse al sitio objetivo dentro del cuerpo. En algunas realizaciones, las MSC administradas sistémicamente albergan sitios de inflamación dentro del cuerpo. Estos sitios de inflamación exhiben mayores perfiles de expresión de moléculas de adhesión, e inducen además cambios conformacionales en moléculas de adhesión como un medio para aumentar la afinidad de las MSC con el tejido inflamado. Si las MSC carecen de las moléculas de adhesión correspondientes, no se adhieren al tejido inflamado y continúan circulando hasta la apoptosis. Por lo tanto, aunque es deseable reducir la expresión de moléculas de adhesión en las MSC en la medida necesaria para evitar la agregación, no es deseable reducir la expresión de moléculas de adhesión en las MSC hasta tal punto que pierdan su capacidad para adherirse a un sitio de un tejido inflamado.

Las sustancias xenogénicas, tales como moléculas extracelulares y de la membrana de la superficie celular, que se desean eliminar incluyen proteínas de suero tales como BSA y otros reactivos de origen no humano para el cultivo de hMSC tales como tripsina porcina. En algunas realizaciones de la presente tecnología, la cantidad de sustancias xenogénicas en las composiciones que comprenden las hMSC expandidas en cultivo después de la purificación es aproximadamente 1 log menor que la presente en un lote comparable de hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es aproximadamente 2 log menor que la presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es aproximadamente 3 log menor que la presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es aproximadamente 4 log menor que la presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es aproximadamente 5 log menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la composición de hMSC expandida en cultivo está sustancialmente libre de sustancias xenogénicas. En algunas realizaciones, no hay sustancias xenogénicas detectables en la composición que comprende las hMSC expandidas en cultivo.

En otras realizaciones de la presente tecnología, la cantidad de sustancias xenogénicas en las composiciones que comprenden las hMSC expandidas en cultivo después de purificación es de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 1.000 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable de hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de purificación es de aproximadamente 25 hasta aproximadamente 750 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de purificación es de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 500 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es de aproximadamente 100 hasta aproximadamente 300 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de sustancias xenogénicas después de la purificación es aproximadamente 200 veces menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo.

En otras realizaciones de la presente tecnología, la cantidad de BSA en las composiciones que comprenden las hMSC expandidas en cultivo después de purificación es aproximadamente 1 log menor que la cantidad presente en un lote comparable de hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de BSA después de la purificación es aproximadamente 2 log menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de BSA después de purificación es aproximadamente 3 log menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de BSA después de la purificación es de aproximadamente 4 log menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de BSA después de purificación es aproximadamente 5 log menor que la cantidad presente en un lote comparable que comprende hMSC no purificadas, expandidas en cultivo. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la composición de hMSC expandida en cultivo puede estar sustancialmente libre de BSA. En

alternativamente aproximadamente de 600 veces menor; alternativamente aproximadamente de 500 veces menos; Alternativamente alrededor de 400 veces menos; Alternativamente alrededor de 300 veces menos; alternativamente aproximadamente 200 veces menor; alternativamente aproximadamente de 100 veces menor; alternativamente aproximadamente 50 veces menor; o alternativamente aproximadamente 25 veces menor.

5 En algunas realizaciones de la presente tecnología, las MSC purificadas pueden ser almacenadas en un medio de crioconservación apropiado, por ejemplo un medio de crioconservación que comprende DMSO. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica de MSC puede comprender MSC y aproximadamente 20% de DMSO. En otras realizaciones, una composición farmacéutica de MSC puede comprender MSC y aproximadamente 10% de DMSO. En otras realizaciones, una composición farmacéutica de MSC puede comprender MSC y aproximadamente 3,8% de DMSO. En algunas realizaciones, se puede añadir DMSO a MSC purificadas.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere a revertir, prevenir, aliviar o inhibir el progreso de una enfermedad, trastorno o afección, o uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección. Tal como se usa en la presente memoria, "tratamiento" también puede referirse a disminuir la probabilidad o incidencia de la ocurrencia de una enfermedad, trastorno o afección en un mamífero comparado con una población de control no tratada, o comparado con el mismo mamífero antes del tratamiento. Por ejemplo, tal como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" puede referirse a la prevención de una enfermedad, trastorno o afección, y puede incluir el retraso o la prevención de la aparición de una enfermedad, trastorno o afección o el retraso o prevención de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" también puede referirse a la reducción de la severidad de una enfermedad, trastorno o afección o de los síntomas asociados con tal enfermedad, trastorno o afección antes del padecimiento con la enfermedad, trastorno o afección. Tal prevención o reducción de la severidad de una enfermedad, trastorno o afección previa al padecimiento se refiere a la administración de la composición de la presente tecnología, tal como se describe en la presente memoria, a un sujeto que no está al momento de la administración padeciendo de la enfermedad, trastorno o afección. Tal como se usa en la presente memoria, "tratamiento" también puede referirse a la prevención de la recurrencia de una enfermedad, trastorno o afección de uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o afección. Los términos "terapia", "tratamiento" y "terapéuticamente", como se utilizan aquí, se refieren al acto de tratamiento como se definió anteriormente.

20 El término "expandido en cultivo" en referencia con las hMSC significa el paso de las hMSC una o más veces bajo condiciones estándar de cultivo celular en un medio mínimo esencial (i) esencialmente libre de células de origen hematopoyético; y, (ii) suplementado con FBS al 10% (en volumen) dando como resultado un mayor número de MSC no diferenciadas.

25 El término "composición farmacéutica" se refiere a composiciones en cualquier etapa del procedimiento de fabricación, incluyendo el producto final farmacéuticamente aceptable y cualquier compuesto intermedio del mismo en el proceso.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente tecnología pueden ser producidas por contacto de una preparación que incluye células madre mesenquimales con una solución de lavado, agitando la preparación y la solución de lavado y recuperando las células madre mesenquimales purificadas.

35 En algunas realizaciones, la solución de lavado puede incluir una solución electrolítica que comprende uno o más compuestos iónicos o ionizables. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, gluconato de sodio, acetato de sodio trihidratado, cloruro de potasio y cloruro de magnesio, fosfato de sodio y fosfato de potasio. La solución de lavado puede estar constituida por una solución equilibrada de electrolito, estando compuesta la solución equilibrada de electrolito de una concentración apropiada de sodio, potasio, cloruro o combinaciones de los mismos para mantener una osmolalidad normal. Las soluciones electrolíticas equilibradas incluyen soluciones salinas conocidas usadas en una variedad de composiciones, incluyendo, por ejemplo, terapia de reemplazo de electrolitos del fluido, lavado de tejidos y células, y diluyentes para células y otros factores.

40 En una realización, por ejemplo, la solución de lavado puede ser una solución isotónica no pirogénica que, por cada 100 mL de solución, hay aproximadamente 526 mg de cloruro de sodio, 502 mg de gluconato de sodio ($C_6H_{11}NaO_7$), 368 mg de acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), 37 mg de cloruro de potasio y 30 mg de cloruro de magnesio. Una de tales soluciones isotónicas comercialmente disponibles de electrolitos es vendida como PlasmaLyte A, un producto de Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Illinois.

45 En otra realización, las células madre mesenquimales se lavan en un aparato que incluye, por ejemplo, una bolsa que provee células, una bolsa de solución de lavado, una bolsa de recirculación del lavado, un filtro de membrana de centrífuga que tiene puertos de entrada y salida, una bolsa de filtrado, una zona de mezcla, una bolsa de producto final para las células lavadas y tubería apropiada. El aparato puede ser un sistema cerrado, reduciendo así el potencial de contaminación.

Las MSC sin lavar de la bolsa que provee las células se pueden mezclar con la solución de lavado en el dispositivo de filtración centrífuga. La suspensión resultante de células madre mesenquimales en la solución de lavado se alimenta luego al filtro de membrana de centrifuga a través de un puerto de entrada. Se extrae un filtrado que comprende una solución de lavado del filtro de membrana de centrifuga a través de un primer puerto de salida y se extrae una suspensión concentrada de MSC del filtro de membrana de centrifuga a través de un segundo puerto de salida y se introduce en la bolsa de lavado de recirculación. Las MSC se extraen luego de la bolsa de lavado de recirculación, se mezclan con solución de lavado adicional y se envían de nuevo al filtro de membrana de centrifuga. Cuando se completa el lavado de recirculación de las MSC, se envían las MSC lavadas a la bolsa de producto.

La Figura 1 muestra un ejemplo de aparato para lavar o purificar las MSC. Un ejemplo de tal aparato se describe adicionalmente en la patente estadounidense No. 6.251.295. El aparato, como se indica en la patente estadounidense No. 6.251.295, puede incluir, por ejemplo, una bolsa 5 de recirculación que tiene un puerto 2 superior y un puerto 1 inferior; un filtro 6 de membrana de centrifuga que tiene un puerto 11 de entrada para una suspensión diluida de MSC, un puerto 14 de salida para una suspensión concentrada de MSC y un puerto 24 de salida para el filtrado; y una bolsa 30 de filtrado que tiene un puerto 29 de entrada. También puede incluir una o más de una bolsa 46 de células lavadas que tiene un puerto 47 de salida, una bolsa 44 de células no lavadas que tiene un puerto 45 de salida y una bolsa 7 de solución de lavado que tiene un puerto 21 de salida. Se conecta el puerto 2 superior de la bolsa 5 mediante tubería 8 a un conector 49. El puerto 21 de la bolsa 7 de solución de lavado se conecta mediante tubería 15 al conector 55 en Y y este último se conecta mediante tubería 20 que tiene una abrazadera C1 al conector 49. El puerto 45 de la bolsa de células sin lavar se conecta mediante tubería 43 que tiene una abrazadera C3 al conector 53 en Y y luego mediante la tubería 51 al conector 49. El conector 49 sirve como zona de mezcla para las células sin lavar en la solución de lavado de la bolsa 44, recirculando las células en la solución de lavado de la bolsa 5 y la solución de lavado de la bolsa 7. El conector 49 se conecta mediante tubería 10 al puerto 11 de entrada del filtro 6 de la membrana de centrifuga. El puerto 24 de salida del filtrado de la centrifuga 6 se conecta mediante la tubería 23 al conector 54 en Y y mediante la tubería 26 al puerto 29 de entrada de la bolsa 30 del filtrado. El conector 55 se conecta mediante la tubería 52 que tiene la abrazadera C2 al conector 54. El conector 54 se conecta mediante la tubería 41 al transductor 50 de presión. El puerto 14 de salida de la centrifuga 6 se conecta mediante la tubería 13 al puerto 1 inferior de la bolsa 5. El conector 53 en Y se conecta mediante la tubería 48 que tiene la abrazadera C4 al puerto 47 de entrada de la bolsa 46 de células lavadas.

Durante el lavado por recirculación, se extrae una suspensión de MSC en solución de lavado de la bolsa 5 a través del puerto 2 superior y fluye a través de la tubería 8 hasta la zona 49 de mezcla. Se extrae una suspensión de MSC de la bolsa 44 a través del puerto 45 y (con la abrazadera C3 abierta y la abrazadera C4 se cerrada) a través de la tubería 43 hasta el conector 53 en Y y luego a través de la tubería 51 hasta la zona 49 de mezcla mediante la bomba P2 de transferencia. Se extrae la solución de lavado de la bolsa 7 a través del puerto 21 y la tubería 15 hasta el conector 55 mediante la bomba P2 de amortiguación. Con la abrazadera C1 abierta, la solución de lavado fluye a través de la tubería 20 hasta la zona 49 de mezcla. Una suspensión de MSC en solución de lavado fluye desde la zona 49 de mezcla a través de la tubería 10 hasta el puerto 11 de entrada de la centrifuga 6. Una suspensión concentrada de MSC en la solución de lavado fluye a través del puerto 14 de salida de la centrifuga 6 a través de la tubería 13 y el puerto 1 de entrada dentro de la bolsa 5 mediante la bomba P3 de recirculación. El filtrado fluye a través del puerto 24 de salida en la centrifuga 6 y la tubería 23 hasta el conector 54 y, con la abrazadera C2 cerrada, a través de la tubería 26 y el puerto 29 de entrada dentro de la bolsa 30 del filtrado mediante la bomba P4. Se continúa el lavado de recirculación hasta que se ha eliminado la cantidad deseada de componente objetivo de las MSC. Las abrazaderas C1, C2 y C3 se cierran luego, se abre la abrazadera C4 y se invierte la dirección de la bomba P1, de manera que la suspensión de MSC lavadas fluye desde la bolsa 5 a través de las tuberías 8, 51 y 48 y el puerto 47 dentro de la bolsa 46 de células lavadas. Las líneas, la bolsa y la centrifuga se enjuagan luego mediante el cierre de las abrazaderas C1 y C3, abriendo las abrazaderas C4 y C2, y el bombeo del amortiguador con la bomba P2 en serie con las bombas P1 y P3 para enjuagar la centrifuga, la bolsa y la tubería.

El procedimiento de purificación puede incluir centrifugación y filtración secuencial o simultáneas.

Los dispositivos de filtración centrífugos que comprenden membranas de centrifugación, han sido desarrollados para eliminar plaquetas y anticuerpos de los productos sanguíneos. Los ejemplos de dispositivos de filtración centrífugos incluyen aquellos divulgados en, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.034.135, 5.053.121, 5.234.608, 5.536.475 y 6.251.295.

En una o más realizaciones, el filtro de membrana de centrifuga tiene un tamaño de poro desde aproximadamente 3 μm hasta aproximadamente 7 μm . En otra realización, el filtro de membrana tiene un tamaño de poro de aproximadamente 4 μm .

En algunas realizaciones de la presente tecnología, la viabilidad de las células posterior al lavado es aproximadamente mayor al 60%. En otras realizaciones, la viabilidad de las células posterior al lavado es aproximadamente mayor al 70%. En realizaciones adicionales, la viabilidad de las células posterior al lavado es aproximadamente mayor al 80%. En aún otras realizaciones, la viabilidad de las células posterior al lavado es aproximadamente mayor al 90%. En otras realizaciones, la viabilidad de las células posterior al lavado es aproximadamente mayor al 95%.

5 Ciertas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones farmacéuticas de MSC purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente 55 µg/mL de BSA residual; en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y en donde la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%. En otras realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%. En aún otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%. En algunas realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 15 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es aproximadamente mayor al 80%. En otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de purificación es aproximadamente mayor al 80%.

25 Ciertas realizaciones de la presente tecnología se refieren a composiciones farmacéuticas de MSC purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente 55 µg/mL de BSA residual; en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor de 150 µm; y en donde la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En otras realizaciones relacionadas con este aspecto de la presente tecnología, la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En aún otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En algunas realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 15 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%. En otras realizaciones, la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL de BSA residual y aproximadamente 12 µg/mL de BSA residual; la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D₉₀ de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm; y la viabilidad de las MSC después de la purificación es mayor al 70%.

La tecnología actualmente descrita ahora será descrita con respecto al siguiente ejemplo; sin embargo, el alcance de la presente tecnología no pretende estar limitado al mismo.

50 Ejemplo 1: Umbrales para proteínas xenogénicas residuales en composiciones para administración intravenosa

Al documentar las propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad ("ADMET") de composiciones farmacéuticas de MSC, se reportaron muertes esporádicas e impredecibles en poblaciones de prueba con roedores que recibieron MSC. Al estudiar una serie de parámetros, se identificó la cantidad residual de proteínas xenogénicas, la cantidad residual de otros desechos resultantes de la expansión en los medios y el grado de agregación celular, y se comprobó posteriormente que era un factor contribuyente significativo a los eventos adversos observados en experimentos preclínicos.

60 La presente tecnología descubre y estima que, a través de los umbrales de reactividad clínica establecidos para la administración oral de antígenos, los umbrales para la exposición IV a antígenos permanecen desconocidos. Por lo tanto, la presente tecnología reconoce que el problema de comprensión de los umbrales para exposición IV a los antígenos necesita ser resuelto antes de que se pueda diseñar una composición farmacéutica de MSC segura y por lo

tanto El procedimiento de fabricación. Para entender las reacciones adversas asociadas con los productos celulares y de origen animal, tales como la anafilaxia y una enfermedad similar a la enfermedad del suero, en el contexto de la administración intravenosa de composiciones que comprenden MSC, se empleó un modelo animal para determinar el potencial antigénico de los residuos xenogénicos.

5 Se seleccionó ovoalbúmina ("OVA") como una proteína xenogénica representativa, ya que está estructuralmente relacionada con BSA, significativamente más inmunogénica que BSA y tripsina, y se documentó en un número significativo de reportes publicados. BSA tiene un potencial alergénico significativamente menor en comparación con OVA (Hilton J. y colaboradores, Food Chem Toxicol, 1997, 35: 1209).

10 Se administró OVA mediante inyección sistémica, no mucosa, intraperitoneal (IP) ya que esta ruta se consideró más relevante para la administración intravenosa. Se ha demostrado que las rutas IP e IV de administración de antígenos en animales dan como resultado un resultado similar (Shepard y colaboradores, Infection and Immunity, 1982, 38: 673).

15 Para el cálculo de las tolerancias de umbral de BSA y de tripsina en una composición farmacéutica de MSC, se seleccionó la dosis acumulativa más baja de OVA que no desencadenó una respuesta de IgE detectable. La dosis de OVA acumulativa más baja que no desencadenó la sensibilización cuando se administra en forma IP es 10 µg/ratón, que corresponde a 500 µg/kg con base en un peso corporal promedio por ratón de 20 g. Por lo tanto, una dosis acumulativa segura de residuos de proteína animal en composiciones farmacéuticas de MSC para pacientes no susceptibles que reciben tratamientos con MSC es de 500 µg/kg. De acuerdo con el límite de seguridad, se podría administrar en forma segura un paciente de 100 kg, una composición farmacéutica de MSC que comprende aproximadamente menos de 50 mg de proteína animal; a un paciente de 40 kg se le podría administrar en forma segura una composición farmacéutica de MSC que comprende aproximadamente menos de 20 mg de proteína animal; o a un paciente pediátrico de 5 kg se le podría administrar en forma segura una composición farmacéutica de MSC que comprende aproximadamente menos de 2,5 mg de proteína animal.

25 Habiendo reconocido y resuelto el problema asociado con el umbral de exposición IV a los antígenos, se podrían implementar ahora los parámetros para un proceso de fabricación adecuado para producir una composición farmacéutica segura de MSC. Para la terapia que consiste de 2 infusiones intravenosas de 8×10^6 MSC/kg de peso corporal por tratamiento, se calculó un umbral para BSA residual y de tripsina por composición farmacéutica de MSC (830 µg correspondiente a 55 µg/mL) como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Umbrales para sustancias xenogénicas en una composición farmacéutica de MSC para administración IV

Peso corporal del paciente	Dosis acumulativa para residuos	Células/kg por dosis	No. de tratamientos de hMSC/infusiones	Dosis de células por infusión (x 10 ⁶)	Dosis de células por tratamiento – 2 infusiones (x10 ⁶)	Dosis acumulativa de células – 3 tratamientos (x 10 ⁶)	No. Total de bolsas de producto final	Residuos permitidos por bolsa de producto final (mg)	Cantidad permitida de residuos (µg/mL)
5 kg	2,5 mg	8 x 10 ⁸	3/6	40	80	240	2,5-3	0,831	55,3-66,7
40 kg	20 mg	8 x 10 ⁶	3/6	320	640	1920	19-20	1-1,05	66,7-70
100 kg	50 mg	8 x 10 ⁶	3/6	800	1600	4800	48	1,04	69,3
300 kg	150 mg	8 x 10 ⁶	3/6	2400	4800	14400	144	1,04	69,3

Ejemplo 2 Pureza de la composición farmacéutica de MSC

Para evaluar los efectos potenciales de las MSC expandidas en cultivo sobre el cambio potencial en la función pulmonar en función de la pureza de la composición farmacéutica de MSC, se preparó una composición farmacéutica de hMSC que consiste esencialmente de: 1) una población de MSC; y, 2) un vehículo consiste de 85% de PlasmaLyte A, 10% de DMSO y 5% de FBS (en volumen).

Los experimentos señalados en este Ejemplo 2 se llevaron a cabo de acuerdo con las Regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos codificadas en la norma 21 de CFR 58, excepto que no existía documentación de la concentración, pureza y composición del componente PlasmaLyte del vehículo (adquirido como un componente estéril). La fabricación del artículo de ensayo se realizó de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura. La selección de especies y el número de animales analizados fueron respaldados por las guías de la FDA para Estudios de Agudos Ampliados, las Pautas Tripartitas Armonizadas de la ICH, la Guía de la FDA para Terapia Celular Somática Humana y Terapia Génica y procedimientos generalmente aceptados para pruebas farmacológicas preclínicas.

Se cultivó una población de MSC derivada de médula ósea de rata de la siguiente forma. Se enjuagó la médula recolectada con solución amortiguada de Hank. Se combinaron, las células se contaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min. Se sembraron en matraces las células a razón 120×10^6 célula/cm² en 10% de FBS, 45% de F-12 de Ham, 45% de medio esencial mínimo alfa ("α-MEM") suplementado con 100U/mL de penicilina G y 100 µg/mL de sulfato de estreptomina. Se incubaron los matraces en CO₂ al 10% a 37°C. Después de 8 días, se retiraron las células no adherentes y las células restantes se separaron con tripsina porcina al 0,05% y EDTA 0,53 mM. Las células adherentes se sembraron nuevamente en placa a razón de 2.000 células/cm². Se realizaron dos (2) pases subsiguientes a intervalos de 4 días.

Después de la expansión, se obtuvo una alícuota de la suspensión de células para evaluar los niveles residuales de BSA. Se lisaron las células de la alícuota antes de realizar un ELISA para determinar la BSA residual, cuyos resultados se exponen en la Tabla 2. Las MSC en α-MEM fueron entonces congeladas en crioviales que contenían un número conocido de MSC.

Para preparar las formulaciones de dosificación para cada concentración, se calculó el volumen de suspensión final estimado a partir de la concentración deseada de células y el recuento estimado de células por criovial asumiendo una viabilidad del 90% de las MSC. La cantidad de vehículo necesaria para alcanzar el volumen de suspensión final estimado se transfirió a un tubo cónico. Los crioviales que contienen la población de MSC se transfirieron desde el almacenamiento en nitrógeno líquido a un baño de agua hasta que se descongelaron a semilíquidos. Se transfirieron aproximadamente 0,5 mL de vehículo a cada criovial para facilitar la descongelación completa. Se transfirió la población de MSC al tubo cónico en cuyo momento se purificó la población mediante: (A) Centrifugación Básica; o, (B) Filtración centrífuga.

(A) Centrifugación Básica. Se centrifugó la suspensión de célula/vehículo durante aproximadamente 10 minutos a 500 g de fuerza a 4°C (1480 – 1540, 3.000 RPM en un rotor Beckman GS-6R GH 3.8). Se removió el sobrenadante y se mantuvo en un vial separado. Se resuspendieron las células precipitadas con vehículo si fuera necesario. Se contaron las MSC y se confirmó la viabilidad. Con base en el recuento total de células, se añadió la cantidad de vehículo necesaria para lograr el volumen de suspensión final deseado para proporcionar una composición farmacéutica de hMSC. Se analizaron las composiciones purificadas por centrifugación básica mediante ELISA para determinar la BSA residual, cuyos resultados se exponen en la Tabla 2.

(B) Filtración Centrífuga. Se lavó la suspensión de células/vehículo durante aproximadamente 25 minutos a temperatura ambiente en un sistema de procesamiento de células Cytomate (vendida por Baxter en 2007) que tiene un filtro de membrana para centrífuga con un tamaño de poro de aproximadamente 4 µm y utilizando una configuración de las veces que se produce una reducción residual (RFR) de 150. Se hizo un recuento de las MSC y se confirmó la viabilidad. Las composiciones purificadas por filtración centrífuga se analizaron mediante un ensayo de ELISA para determinar la BSA residual, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Con base en el recuento total de células, se añadió la cantidad necesaria de vehículo para alcanzar el volumen de suspensión final deseado para proporcionar una composición farmacéutica de hMSC. Todas las composiciones farmacéuticas de hMSC se prepararon menos de 4 horas antes de la administración. Se dosificaron los animales a través de catéter femoral. Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, las composiciones farmacéuticas de MSC purificadas por filtración centrífuga no demostraron muertes mientras que las composiciones farmacéuticas de MSC purificadas por técnicas de centrifugación tradicionales dieron como resultado una mortalidad del 80%. Se determinó que las causas de muerte fueron por embolia pulmonar.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Número de ratas	10	10	10	10	10
Número de células en infusión	37,5x10 ⁶ células/kg	37,5 x10 ⁶ células/kg	75x10 ⁶ células/kg	cero, sólo solución salina	cero, sólo vehículo
Método de Purificación	Centrifugación básica	Filtración centrífuga	Filtración centrífuga	n/a	n/a
Viabilidad después del lavado (antes de la infusión)	68,7%	67,8%	67,8%	n/a	n/a
Resultados	7 ratas murieron inmediatamente después de la infusión; 1 muerte después de 24 horas de la infusión; 2 sobrevivieron hasta la necropsia planeada	Sin muertes no programadas	Sin muertes no programadas	Sin muertes no programadas	Sin muertes no programadas

De los diversos parámetros estudiados posteriormente, un segundo análisis que compara la cantidad de BSA residual presente en una composición de MSC con los límites del nivel de eventos adversos no observados ("NOAEL"), cuyos resultados se muestran en la Tabla 3, proporcionó los resultados más sorprendentes.

5

Método de proceso	BSA residual (µg/mL)	Nivel de eventos adversos no observados	Número de ratas
Sin procesamiento	26,00	No determinado	No determinado
Centrifugación básica	1,29	4 x10 ⁶ células/kg	10
Filtración Centrífuga	0,13	40 x10 ⁶ células/kg	120

10

De las 10 ratas infundidas con una composición de MSC purificada por centrifugación básica a la que se hace referencia en la Tabla 2, 7 ratas murieron inmediatamente después de la dosificación, 1 rata murió al día siguiente de la dosificación y 2 ratas sobrevivieron 14 días hasta la necropsia terminal planificada. Antes de continuar con otros estudios de fase preclínica o clínica, existió el deseo de aumentar el margen de seguridad proporcionado por las composiciones de MSC purificadas por centrifugación básica.

15

Se realizó una prueba toxicológica adicional sobre composiciones farmacéuticas de MSC purificadas por filtración centrífuga. En este experimento, se administró a 120 ratas 10x10⁶ células/kg, 40x10⁶ células/kg, o 75x10⁶ células/kg. De las 120 ratas estudiadas sólo 2 animales murieron durante el estudio. Para reforzar aún mas los resultados binarios completos (supervivencia total o fatalidad tota) de este experimento se observó también que los animales que recibieron composiciones farmacéuticas de MSC filtradas de forma centrífuga no mostraron casi ningún síntoma clínico, incluso con un nivel de dosis dos veces tan alto (75x10⁶ células/kg) como el fatal cuando se purificó por centrifugación básica.

Después de realizar este experimento, se adaptaron todos los protocolos de procesamiento de células para la filtración centrífuga.

5 Como se muestra en la Tabla 3, se encontró que las composiciones de MSC purificadas por centrifugación básica tenían 1,29 µg/mL de BSA residual que dio como resultado una NOAEL de 3×10^6 células/kg. Comparativamente, se encontró que las composiciones de MSC purificadas por filtración centrífuga tenían 0,13 µg/mL de BSA residual que dio como resultado una NOAEL de 40×10^6 células/kg presentando por lo tanto un aumento de aproximadamente 10 veces en los márgenes de seguridad. Como la disminución de aproximadamente 20 veces en BSA residual entre composiciones de MSC no purificadas y composiciones de MSC purificadas por centrifugación no aumentó el límite de NOAEL a una dosis clínicamente significativa (por ejemplo 10×10^6 células/kg, 40×10^6 células/kg, o 75×10^6 células/kg) y todavía resultó en mortalidad completa a $37,5 \times 10^6$ células / kg, fue bastante sorprendente observar que un aumento adicional de 10 veces en la pureza aumentaría el límite de NOAEL 1 log adicional y también dio como resultado una supervivencia completa de la población analizada de animales.

10 Al analizar en combinación los residuos de bovinos y porcinos, la filtración centrífuga redujo el nivel residual de proteínas animales aproximadamente 1000 veces con respecto a la centrifugación básica. Esta reducción de 1000 veces aumentó la dosis máxima tolerada para la infusión en bolo de 20×10^6 células/kg hasta 65×10^8 células/kg.

15 Las fotografías tomadas con un aumento de 10x de una composición de MSC no purificada (Figura 2), una composición de MSC purificada por centrifugación (Figura 3) y una composición de MSC purificada por filtración centrífuga (Figura 4) muestran la tendencia reducida de composiciones de MSC purificadas por filtración centrífuga para formar agregados.

Se describirán a continuación realizaciones adicionales de la presente tecnología descrita; sin embargo, el alcance de la presente tecnología no pretende estar limitado por las mismas. Las realizaciones adicionales de la presente tecnología incluyen:

20 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 µm.

La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 94, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 100 µm

25 La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 95 en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 50 µm.

La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los párrafos 94 - 96, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor a 70%.

30 La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 97, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor a 80%.

La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los párrafos 94-98, que comprenden además dimetilsulfóxido (DMSO).

La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 99 que comprende aproximadamente 10% de DMSO.

La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 99 que comprende aproximadamente 3,8% de DMSO.

35 [Párrafo 98] Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de albúmina de suero bovino residual y en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm.

La composición del párrafo 102, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.

40 La composición del párrafo 103, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.

La composición del párrafo 104, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.

45 La composición del párrafo 105, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.

- La composición del párrafo 102, en donde la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL y aproximadamente 15 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 107, en donde la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL y aproximadamente 12 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 5 La composición de cualquiera de los párrafos 102 - 108, en donde las células madre mesenquimales presentan un D₉₀ entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm.
- La composición del párrafo 109, en donde las células madre mesenquimales presentan un D₉₀ entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 25 µm.
- 10 La composición de cualquiera de los párrafos 102 - 110, en donde las células madre mesenquimales se expanden en cultivo en un medio que comprende albúmina de suero bovino.
- La composición de cualquiera de los párrafos 102 - 110, en donde las células madre mesenquimales se expanden en cultivo en un medio que comprende suero animal.
- La composición del párrafo 112, en donde el suero animal es suero humano.
- La composición del párrafo 112, en donde el suero animal es suero no humano.
- 15 La composición del párrafo 114, en donde el suero no humano es suero bovino.
- La composición del párrafo 114, en donde el suero no humano es suero porcino.
- La composición de cualquiera de los párrafos 102 - 116, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor al 70%.
- 20 La composición del párrafo 117, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor al 80%.
- La composición de cualquiera de los párrafos 102 - 118, que comprende además dimetilsulfóxido (DMSO).
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 119, que comprende aproximadamente 10% de DMSO.
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 119, que comprende aproximadamente 3,8% de DMSO.
- 25 Un procedimiento para preparar una composición de células madre mesenquimales purificadas que comprende las etapas de:
- (i) Obtener una preparación que contiene células madre mesenquimales cultivadas *ex vivo*;
 - (ii) poner en contacto la preparación con una solución de lavado para crear una mezcla;
 - (iii) Agitar la mezcla con un dispositivo de filtración centrífuga; y,
 - (iv) Recuperar la composición de células madre mesenquimales purificada.
- 30 El procedimiento del párrafo 122, en donde dichas células madre mesenquimales cultivadas *ex vivo* se cultivan en medios que comprenden albúmina de suero bovino.
- El procedimiento del párrafo 122, en donde dichas células madre mesenquimales cultivadas *ex vivo* se cultivan en medios que comprenden suero animal.
- El procedimiento del párrafo 124, en donde el suero animal es suero humano.
- 35 El procedimiento del párrafo 124, en donde el suero animal es suero no humano.
- El procedimiento del párrafo 126, en donde el suero no humano es suero bovino.
- El procedimiento del párrafo 127, en donde el suero no humano es suero porcino.

ES 2 608 974 T3

- El procedimiento de cualquiera de los párrafos 122 - 128, en donde dicha composición de células madre mesenquimales purificada comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- El procedimiento del párrafo, en donde la composición de células madre mesenquimales purificada comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 5 El procedimiento del párrafo 130, en donde la composición de células madre mesenquimales purificada comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- El procedimiento del párrafo 131, en donde la composición de células madre mesenquimales purificadas comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 10 El procedimiento del párrafo 132, en donde la composición de células madre mesenquimales purificada comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- El procedimiento de cualquiera de los párrafos 122 - 128, en donde dicha composición de células madre mesenquimales purificada comprende entre aproximadamente 7 µg/mL y aproximadamente 15 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 15 El procedimiento del párrafo 134, en donde dicha composición de células madre mesenquimales purificada comprende entre aproximadamente 8 µg/mL y aproximadamente 12 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- El procedimiento de cualquiera de los párrafos 122 - 135, que comprende además la adición de DMSO a dicha composición de células madre mesenquimales purificadas.
- El procedimiento del párrafo 136, en donde dicha composición comprende aproximadamente 10% de DMSO.
- El procedimiento del párrafo 136, en donde dicha composición comprende aproximadamente el 3,8% de DMSO.
- 20 Una composición de células madre mesenquimales purificada obtenida por el procedimiento de cualquiera de los párrafos 122 - 132.
- Una composición de células madre mesenquimales purificada producida por:
- (i) Cultivo de células madre mesenquimales en medios que comprenden suero;
- (ii) Obtención de una preparación que comprende dichas células madre mesenquimales;
- 25 (iii) Poner en contacto la preparación con una solución de lavado para crear una mezcla;
- (iv) Agitación de la mezcla con un dispositivo de filtración centrífuga; y,
- (v) Recuperación de una composición de células madre mesenquimales purificada.
- La composición del párrafo 140, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 30 µm.
- 30 La composición del párrafo 141, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 µm y aproximadamente 25 µm.
- La composición del párrafo 142, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 µm y aproximadamente 25 µm.
- 35 La composición de cualquiera de los párrafos 140 - 143, en donde dicho suero es suero bovino y dicha composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 144, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 145, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.

- La composición del párrafo 146, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 147, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 5 La composición de cualquiera de los párrafos 140 -143, en donde dicho suero es suero bovino y dicha composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL y aproximadamente 15 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 149, en donde dicha composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL y aproximadamente 12 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 10 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde dichas células madre mesenquimales se expanden en cultivo en medios que contienen albúmina de suero bovino; y en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 151, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 15 La composición del párrafo, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 25 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 153, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo, en donde dicha composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 20 La composición del párrafo 151, en donde dicha composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL y aproximadamente 15 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 156, en donde dicha composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL y aproximadamente 12 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 25 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 55 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 158, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 42 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 159, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 2,5 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 30 La composición del párrafo 160, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 13 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 161, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 10 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- 35 La composición del párrafo 158, en donde la composición comprende entre aproximadamente 7 µg/mL y aproximadamente 15 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición del párrafo 163, en donde la composición comprende entre aproximadamente 8 µg/mL y aproximadamente 12 µg/mL de albúmina de suero bovino residual.
- La composición de cualquiera de los párrafos 158 - 164, que comprende además DMSO.
- La composición del párrafo 165, que comprende además aproximadamente 10% de DMSO.
- 40 La composición del párrafo 165, que comprende además aproximadamente 3,8% de DMSO.

- 5 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm ; en donde la composición comprende entre aproximadamente 8 $\mu\text{g/mL}$ y aproximadamente 12 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual; y en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 30 μm .
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 168 en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 100 μm .
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 169, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 50 μm .
- 10 La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los párrafos 168 - 170, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 25 μm
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 171, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 25 μm .
- Un método para preparar una composición de células madre mesenquimales purificadas que comprende las etapas de:
- 15 (i) obtener una suspensión de células que comprende una pluralidad de células madre mesenquimales;
- (ii) seleccionar simultáneamente células madre mesenquimales de la suspensión con base en la masa y el diámetro.
- El método del párrafo 173, que comprende además la etapa de poner en contacto dicha suspensión con una solución de lavado.
- 20 El método del párrafo 174, en donde dicha composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y los agregados presentan un D_{90} de dichos agregados aproximadamente menos de 150 μm .
- El método del párrafo 175, en donde los agregados presentan un D_{90} de dichos agregados aproximadamente menos de 100 μm .
- El método del párrafo 176, en donde los agregados presentan un D_{90} de dichos agregados aproximadamente menos de 50 μm .
- El método del párrafo 173, en donde dicha composición comprende agregados de células madre mesenquimales no detectables.
- 25 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 30 μm .
- La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 179, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 25 μm .
- 30 La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 180, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 25 μm .
- La composición de cualquiera de los párrafos 179 - 181, que comprende además DMSO.
- La composición del párrafo 182, que comprende aproximadamente 10% de DMSO.
- La composición del párrafo 182, que comprende aproximadamente 3,8% de DMSO.
- 35 Un método para preparar una composición farmacéutica de células madre mesenquimales que comprende las etapas de:
- (i) Obtener una suspensión de células madre mesenquimales que comprende una pluralidad de células madre mesenquimales y agregados de células madre mesenquimales;
- (ii) Poner en contacto la suspensión con una solución de lavado para crear una suspensión mezclada;
- 40 (iii) Agitar la suspensión mezclada con un dispositivo de filtración centrífuga hasta que los agregados de células madre mesenquimales presenten un D_{90} de aproximadamente menos de 15,0 μm ; y,

(iv) Recuperar la composición farmacéutica de células madre mesenquimales.

El método del párrafo 185, en donde los agregados de células madre mesenquimales presentan el D_{90} de aproximadamente menos de 100 μm .

5 El método del párrafo 186, en donde los agregados de células madre mesenquimales presentan el D_{90} de aproximadamente menos de 5,0 μm .

El método de cualquiera de los párrafos 185 - 187, en donde dicha composición farmacéutica de células madre mesenquimales comprende células madre mesenquimales que presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 30 μm .

10 El método del párrafo 188, en donde dicha composición farmacéutica de células madre mesenquimales comprende células madre mesenquimales que presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 25 μm .

El método del párrafo 189, en donde dicha composición farmacéutica de células madre mesenquimales comprende células madre mesenquimales que presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 25 μm .

Una composición que comprende una población de células madre mesenquimales purificadas obtenidas por el método de cualquiera de los párrafos 185 - 190, en donde la viabilidad de las células es aproximadamente mayor al 70%.

15 La composición del párrafo 191, en donde la viabilidad de las células es aproximadamente mayor al 80%.

La composición de cualquiera de los párrafos 185 - 192, que comprende además DMSO.

La composición del párrafo 193, que comprende aproximadamente 10% de DMSO.

La composición del párrafo 193, que comprende aproximadamente 3,8% de DMSO.

20 Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y dichos agregados presentan un D_{90} de aproximadamente menos de 150 μm ; y en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 30 μm .

La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 196, en donde dichos agregados presentan una D_{90} de aproximadamente menos de 100 μm .

25 La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 197, en donde dichos agregados presentan un D_{90} de aproximadamente menos de 50 μm .

La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los párrafos 196 - 198 en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 25 μm .

30 La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 199, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 20 μm y aproximadamente 25 μm .

La composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los párrafos 196 - 200, en donde dicha composición comprende entre aproximadamente 7 $\mu\text{g/mL}$ y aproximadamente 15 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.

La composición farmacéuticamente aceptable del párrafo 201, en donde dicha composición comprende entre aproximadamente 8 $\mu\text{g/mL}$ y aproximadamente 12 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.

35 Un método para seleccionar una suspensión de células que contiene al menos una proteína no humana para administración a un paciente que comprende las etapas de:

(a) obtener al menos una muestra representativa de dicha suspensión de células;

(b) determinar el nivel de dicha proteína no humana presente en dicha muestra; e

40 (c) identificar dicha suspensión de células como adecuadas para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 42 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

El método del párrafo 203, en donde dichas células humanas son células madre mesenquimales.

El método del párrafo 203, en donde dicha proteína no humana es albúmina.

El método del párrafo 203, en donde dicha proteína no humana es albúmina de suero bovino.

El método del párrafo 205 o 206, en donde la etapa (b) comprende:

- 5
- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un anticuerpo antialbúmina; y
 - ii. cuantificar un nivel de albúmina en dicha muestra.

El método del párrafo 203, en donde dicha proteína no humana es tripsina.

El método del párrafo 203, en donde dicha proteína no humana es tripsina porcina.

El método del párrafo 208 o 209, en donde la etapa (b) comprende:

- 10
- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un agente que se une selectivamente a tripsina; y
 - ii. cuantificar un nivel de tripsina en dicha muestra.

El método del párrafo 210, en donde dicho al menos un agente es un inhibidor de tripsina.

El método del párrafo 210, en donde dicho al menos un agente es un anticuerpo antitripsina.

El método del párrafo 203, en donde la etapa (b) comprende:

- 15
- i. poner en contacto dicha muestra con un inhibidor de tripsina inmovilizado para formar un conjugado de inhibidor tripsina inmovilizado-tripsina;
 - ii. poner en contacto dicho conjugado inmovilizado con un anticuerpo antitripsina para formar un complejo de inhibidor de tripsina inmovilizado-tripsina-anticuerpo; y
 - iii. detectar una señal generada por dicho complejo.

- 20
- Una composición farmacéutica seleccionada por el método de cualquiera de los párrafos 203, 208 – 209 o 211 - 213.

Un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende las etapas de:

(a) incubar células humanas en medios que comprenden una proteína no humana;

(b) seleccionar una suspensión de células incubadas que contiene aproximadamente menos de 42 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro;

- 25
- (c) administrar dicha suspensión de células a dicho sujeto.

El método del párrafo 215, en donde dichas células humanas son células madre mesenquimales.

El método del párrafo 215, en donde dicha proteína no humana es albúmina.

El método del párrafo 215, en donde dicha proteína no humana es albúmina de suero bovino.

El método del párrafo 217 o 218, en donde la etapa (b) comprende:

- 30
- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un anticuerpo anti - albúmina; y
 - ii. cuantificar un nivel de albúmina en dicha muestra.

El método del párrafo 215, en donde dicha proteína no humana es tripsina.

El método del párrafo 215, en donde dicha proteína no humana es tripsina porcina.

El método del párrafo 220 o 221, en donde la etapa (b) comprende:

- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un agente que se une selectivamente a tripsina; y
- ii. cuantificar un nivel de tripsina en dicha muestra.

5 El método del párrafo 222, en donde dicho al menos un agente es un inhibidor de tripsina.

El método del párrafo 222, en donde dicho al menos un agente es un anticuerpo antitripsina.

El método del párrafo 215, en donde la etapa (b) comprende:

- i. poner en contacto dicha muestra con un inhibidor de tripsina inmovilizado para formar un conjugado de inhibidor de tripsina inmovilizado-tripsina;
- 10 ii. poner en contacto dicho conjugado inmovilizado con un anticuerpo antitripsina para formar un complejo de inhibidor de tripsina inmovilizado-tripsina-anticuerpo; y
- iii. detectar una señal generada por dicho complejo.

Un método de fabricación de un producto de terapia celular que comprende las etapas de:

(a) incubar células humanas en una solución que comprende una proteína no humana;

15 (b) añadir un volumen de un vehículo líquido a dichas células para obtener una suspensión de células farmacéuticamente aceptable;

(c) obtener al menos una muestra representativa de dicha suspensión de células farmacéuticamente aceptable;

(d) cuantificar una cantidad de dicha proteína no humana presente en dicha muestra; y

20 (e) retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 42 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 30 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

25 El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 25 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 13 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

30 El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 10 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

35 El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene entre aproximadamente 7 y aproximadamente 15 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

El método del párrafo 226, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

El método del párrafo 226, en donde dichas células humanas son células adherentes.

El método del párrafo 226, en donde dichas células humanas son células madre mesenquimales.

El método del párrafo 226, en donde dicha proteína no humana es albúmina.

El método del párrafo 226, en donde dicha proteína no humana es albúmina de suero bovino.

El método del párrafo 235 o 236, en donde la etapa (d) comprende:

- 5
- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un anticuerpo anti-albúmina; y
 - ii. cuantificar un nivel de albúmina en dicha muestra.

El método del párrafo 226, en donde dicha proteína no humana es tripsina.

El método del párrafo 226, en donde dicha proteína no humana es tripsina porcina.

El método del párrafo 238 o 239, en donde la etapa (d) comprende:

- 10
- i. poner en contacto dicha muestra con al menos un agente que se une selectivamente a tripsina; y
 - ii. cuantificar un nivel de tripsina en dicha muestra.

El método del párrafo 240, en donde dicho al menos un agente es un inhibidor de tripsina.

El método del párrafo 240, en donde dicho al menos un agente es un anticuerpo antitripsina.

El método del párrafo 238 o 240, en donde la etapa (d) comprende:

- 15
- i. poner en contacto dicha muestra con un inhibidor de tripsina inmovilizado para formar un conjugado de inhibidor de tripsina inmovilizado-tripsina
 - ii. poner en contacto dicho conjugado inmovilizado con un anticuerpo antitripsina para formar un complejo de inhibidor de tripsina inmovilizado-tripsina-anticuerpo; y
 - iii. detectar una señal generada por dicho complejo.

20

Un método para fabricar un producto de terapia celular que comprende las etapas de:

(a) incubar células humanas en una solución que comprende una tripsina no humana;

(b) añadir un volumen de un vehículo líquido a dichas células para obtener una suspensión de células farmacéuticamente aceptable;

(c) obtener al menos dos muestras representativas de dicha suspensión de células farmacéuticamente aceptable;

25

(d) determinar un nivel de tripsina en una primera muestra;

(e) incubar una segunda muestra en una solución que comprende al menos un agente que se une selectivamente a tripsina para obtener un control;

(f) determinar un nivel de tripsina en dicho control;

30

(g) comparar el nivel de tripsina en dicha primera muestra con el nivel de tripsina en dicho control para obtener un nivel de tripsina en dicha suspensión de células; y

(h) retener dicha suspensión de células de células para administración a un paciente cuando dicha suspensión de células contiene aproximadamente menos de 30 microgramos de tripsina por mililitro.

El método del párrafo 244, que comprende además retener dicha suspensión de células cuando dicha suspensión de células contiene aproximadamente menos de 25 microgramos de tripsina por mililitro.

ES 2 608 974 T3

El método del párrafo 244, que comprende además retener dicha suspensión de células cuando dicha suspensión de células contiene aproximadamente menos de 13 microgramos de tripsina por mililitro.

El método del párrafo 244, que comprende además retener dicha suspensión de células cuando dicha suspensión de células contiene aproximadamente menos de 10 microgramos de tripsina por mililitro.

5 El método del párrafo 244, que comprende además retener dicha suspensión de células cuando dicha suspensión de células contiene entre aproximadamente 7 y aproximadamente 15 microgramos de tripsina por mililitro.

El método del párrafo 244, que comprende además retener dicha suspensión de células cuando dicha suspensión de células contiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 microgramos de tripsina por mililitro.

El método del párrafo 244, en donde dichas células humanas son células madre mesenquimales.

10 El método del párrafo 244, en donde dicho agente es un inhibidor de tripsina.

El método del párrafo 244, en donde dicho agente es un anticuerpo antitripsina.

Un producto de terapia celular fabricado por el método de cualquiera de los párrafos 226 - 236, 238 - 239, o 244 - 252.

Un producto de terapia celular fabricado por el método del párrafo 237.

Un producto de terapia celular fabricado por el método del párrafo 240.

15 Un producto de terapia celular fabricado por el método del párrafo 241.

Un producto de terapia celular fabricado por el método del párrafo 242.

Un producto de terapia celular fabricado por el método del párrafo 243.

20 Una suspensión de células farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales humanas y al menos una proteína no humana, en donde dicha suspensión de células contiene aproximadamente menos de 42 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 30 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

25 La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 25 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 13 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

30 La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene aproximadamente menos de 10 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

35 La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene entre aproximadamente 7 y aproximadamente 15 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

La suspensión de células del párrafo 259, que comprende además retener dicha suspensión de células para administración a un paciente cuando dicha muestra contiene entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 microgramos de dicha proteína no humana por mililitro.

La suspensión de células del párrafo 259, en donde dicha proteína no humana es albúmina.

40 La suspensión de células del párrafo 259, en donde dicha proteína no humana es albúmina de suero bovino.

La suspensión de células del párrafo 259, en donde dicha proteína no humana es tripsina.

La suspensión de células del párrafo 259, en donde dicha proteína no humana es tripsina porcina.

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende uno o más agregados de células madre mesenquimales y el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 150 μm .
- 5 2. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 100 μm .
3. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 2, en donde el D_{90} de dichos agregados es aproximadamente menor a 50 μm .
- 10 4. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor al 70%.
5. La composición farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 4, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es aproximadamente mayor al 80%.
- 15 6. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende células madre mesenquimales purificadas, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 55 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual y en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre aproximadamente 18 μm y aproximadamente 30 μm .
7. La composición de la reivindicación 6, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 42 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 25 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
- 20 9. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 13 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la composición comprende aproximadamente menos de 10 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
- 25 11. La composición de la reivindicación 6, en donde la composición comprende entre 7 $\mu\text{g/mL}$ y 15 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
12. La composición de la reivindicación 11, en donde la composición comprende entre 8 $\mu\text{g/mL}$ y 12 $\mu\text{g/mL}$ de albúmina de suero bovino residual.
13. La composición de la reivindicación 6, en donde las células madre mesenquimales presentan un D_{90} entre 18 μm y 25 μm .
- 30 14. La composición de la reivindicación 6, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es mayor al 70%.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde la viabilidad de las células madre mesenquimales purificadas es mayor al 80%.

Figura 1: Ejemplo de aparato para lavado de las MSC

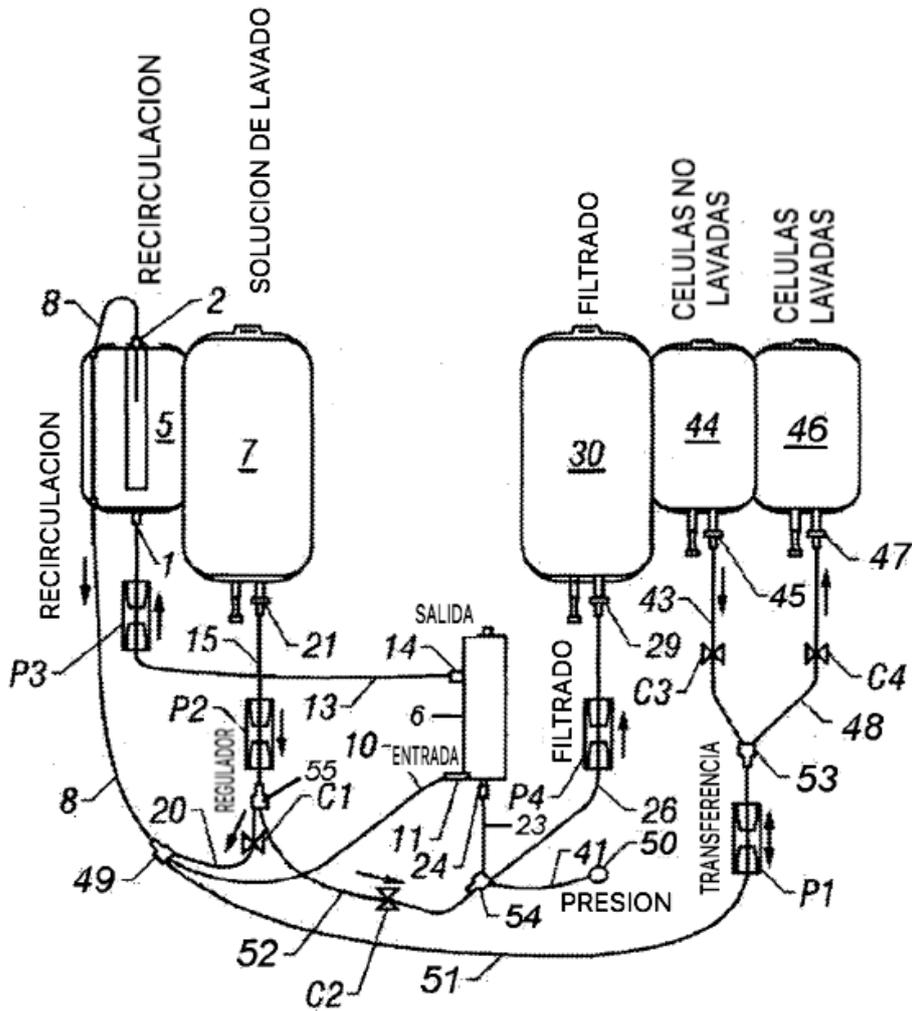


FIG. 1

Figura 2: Composición de MSC no purificada observada con aumento de 10x

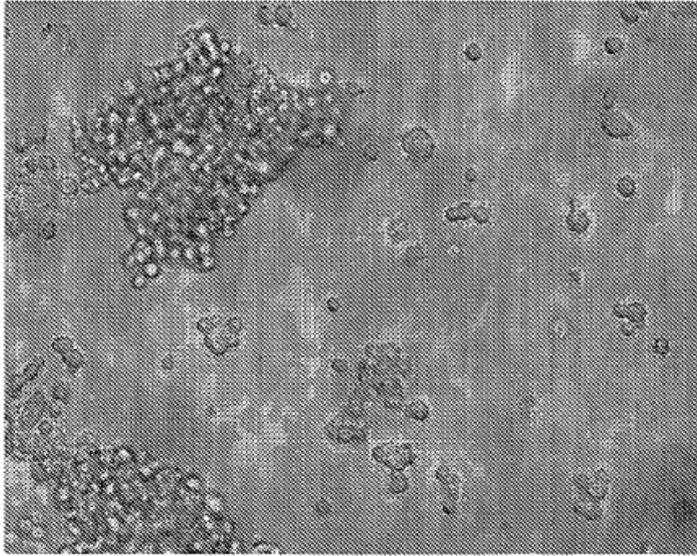


FIG. 2

Figura 3: Composición de MSC purificada por centrifugación observada con aumento de 10x

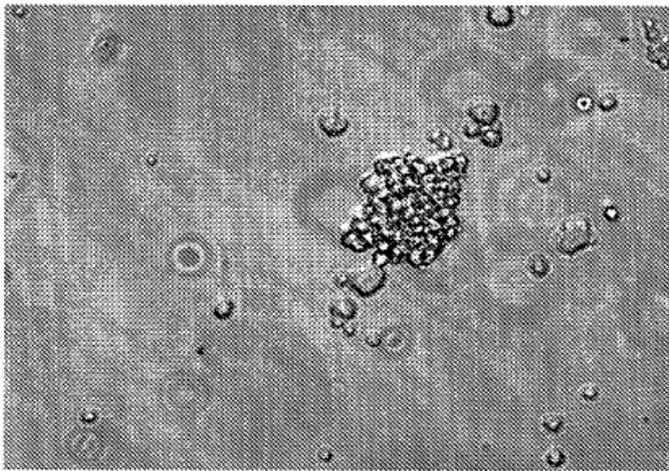


FIG. 3

Figura 4: Composición de MSC purificada por filtración centrífuga observada con aumento de 10x

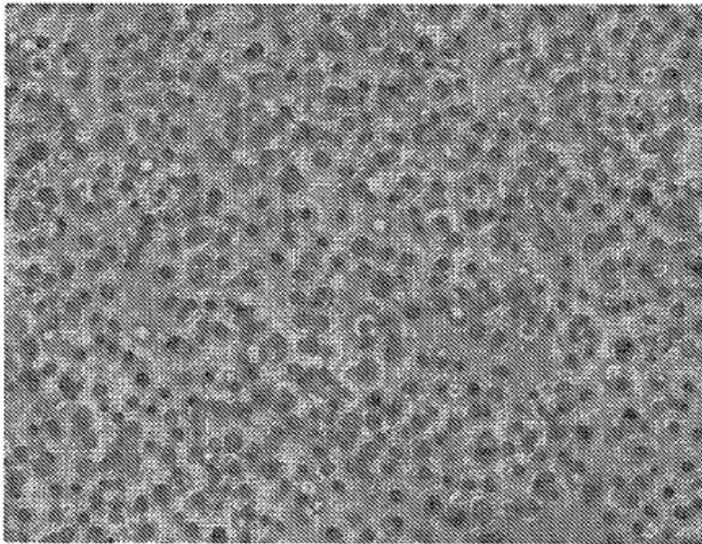


FIG. 4