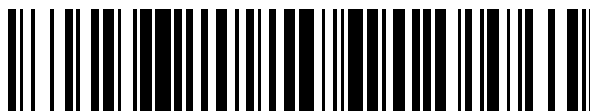


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 881**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.01)
A61K 35/545 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/JP2013/002925**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO2013168403**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13788054 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2848683**

54 Título: **Suspensión de células de mamífero que contienen trehalosa para la prevención de la formación de una embolia pulmonar**

30 Prioridad:

08.05.2012 JP 2012106866

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2017

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.
(100.0%)
115 Aza-Kuguhara Tateiwa Muya-cho
Naruto-shi, Tokushima 772-8601, JP**

72 Inventor/es:

**WADA, TAMAKI;
DOI, MASAKO;
KIKUCHI, TAKESHI y
KOBAYASHI, EIJI**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 614 881 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

Suspensión de células de mamífero que contienen trehalosa para la prevención de la formación de una embolia pulmonar

5

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en la prevención de la formación de una embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión. La presente invención también se refiere a trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en una suspensión de células de mamífero como agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión.

15 **Técnica anterior**

[0002] En los últimos años, el rápido progreso de los estudios sobre células madre ha aumentado el impulso hacia la medicina regenerativa, y el conocimiento y la comprensión de las mismas se han extendido no sólo en los investigadores, sino también en el público. La medicina regenerativa con células madre es una medicina destinada al restablecimiento de la función de las células y tejidos dañados por diversas enfermedades utilizando el potencial de autorenovación y la pluripotencia de células madre o factores secretados por células madre. El trasplante de médula ósea en pacientes que tienen enfermedades hematológicas intratables, tales como la leucemia y anemia aplásica, da lugar al injerto de células madre hematopoyéticas en el cuerpo de estos pacientes, lo que permite el mantenimiento de la capacidad hematopoyética a lo largo de casi toda su vida. Recientemente, muchos investigadores se han dirigido a la aplicación clínica con células madre que no sean células madre hematopoyéticas, han identificado células madre en los nervios centrales, los nervios periféricos, la médula ósea, intestino delgado, y similares, y se ha iniciado el tratamiento de trasplante de células madre para una enfermedad traumática y una enfermedad de degeneración del tejido (documentos no de patente 1 a 3).

[0003] Para el trasplante eficaz de células madre de mamífero en un sitio diana dañado (un sitio afectado), se considera que es importante optimizar un procedimiento (ruta) para el trasplante de células madre. Hasta la fecha, se conocen principalmente 4 tipos de procedimientos, es decir, un procedimiento de trasplante estereotáctico (directo), un procedimiento de trasplante intratecal (intracerebroespinal), un procedimiento de trasplante intravenoso y un procedimiento de trasplante intraarterial, como procedimientos de trasplante de células madre. Entre estos, el procedimiento de trasplante estereotáctico es un procedimiento que implica la transferencia de células madre directamente en un sitio afectado. El uso del procedimiento de trasplante estereotáctico puede aumentar el número de células madre del donante injertante debido a la administración directa en un sitio afectado, disminuyendo así el número de células madre administradas, aunque el procedimiento es ligeramente invasivo. El procedimiento de trasplante intratecal es un procedimiento que implica la transferencia intratecal de células madre por punción ventricular. El procedimiento de trasplante intratecal es un procedimiento que ha sido estudiado principalmente para el tratamiento de enfermedades cerebrales, tales como el infarto cerebral, contusión cerebral y daño de la médula espinal; sin embargo, todavía quedan muchos problemas en la aplicación clínica de los mismos, tales como el riesgo potencial de que la punción ventricular cause un nuevo daño cerebral.

[0004] El procedimiento de trasplante intravenoso y el procedimiento de trasplante intraarterial son procedimientos para la transferencia de células, tales como células madre, por vía intravenosa y por vía intraarterial, respectivamente (procedimientos para la administración a través de los vasos sanguíneos). El uso del procedimiento para la administración a través de un vaso sanguíneo es menos invasiva y sistémicamente pueden circular células, tales como células madre y factores secretados por las células, tales como células madre, aunque se disminuye el número de células hepáticas del donante injertante en comparación con el uso del procedimiento de trasplante estereotáctico. En la actualidad, se conocen un procedimiento que implica el trasplante por vía intravenosa de células madre mesenquimales (MSC) para la enfermedad de infarto cerebral, un procedimiento que implica el trasplante por vía intravenosa de células mononucleares para la enfermedad de infarto cerebral, un procedimiento que implica el trasplante por vía intravenosa de células de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes de tipo I, y similares, como procedimientos practicados clínicamente para la administración a través de un vaso sanguíneo.

[0005] Como riesgo cuando se trasplantan células, tales como células madre, utilizando el procedimiento para la administración a través de un vaso sanguíneo, se ha señalado que las células administradas por vía intraarterial o intravenosa se obstruyen en vasos sanguíneos capilares de la arteria pulmonar (embolia pulmonar) al pasar a través del pulmón, lo que da lugar a una reducción de la función pulmonar y cardíaca (enfermedad embólica pulmonar) y, en algunos casos, plantenado un riesgo que conduce a la muerte. Para prevenir la formación de la embolia pulmonar y la enfermedad embólica pulmonar, las células madre se trasplantan en centros clínicos, mientras se controla la presión parcial de oxígeno en la sangre periférica durante la administración de las células madre mediante un oxímetro de pulso.

65

[0006] Por otro lado, la trehalosa es un tipo de disacárido formado por la unión 1,1-glucosídica de dos moléculas de glucosa. La trehalosa se utiliza en diversos alimentos y cosméticos, ya que presenta un sabor dulce y tiene una capacidad elevada de retención de agua. La trehalosa también se utiliza como un principio activo de una solución protectora de órgano en el trasplante del órgano, ya que tiene las propiedades de estabilización de la membrana celular y de supresión del daño celular. Se han desarrollado excelentes soluciones de conservación de órganos que contienen trehalosa, tal como solución de ET-Kyoto y solución de New ET-Kyoto (documentos de patente 1 y 2 y documento no de patente 4). Sin embargo, no está claro si se reduce o no el riesgo de formación de embolia pulmonar por las células, o si se evita o no la enfermedad embólica pulmonar, cuando las células, tales como las células madre, se suspenden en una solución que contiene trehalosa y la suspensión celular se administra a través de un vaso sanguíneo.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

[0007]

Documento de patente 1: Patente Japonesa N° 3253131
Documento de patente 2: Publicación Internacional N° WO2007/043698

Documentos que no son de patente

[0008]

Documento no de patente 1: Gage, F.H. Science 287: 1433-1438 (2000)
Documento no de patente 2: Morrison, S.J. et al., Cell 96: 737-749 (1999)
Documento no de patente 3: Batle, E. et al., Cell 111: 251-263 (2002)
Documento no de patente 4: Chem., F. et al., Yonsei Med. J. 45: 1107-1114 (2004)

Descripción resumida de la invención

Objetivo a resolver por la invención

[0009] Un objetivo de la presente invención es proporcionar trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en la prevención de la formación de la embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión. Un objetivo adicional es proporcionar trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en una suspensión de células de mamífero como un agente preventivo contra la formación de la embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión.

Medios para resolver el objetivo

[0010] Los presentes inventores encontraron que la suspensión de células madre de mamífero en una solución que contiene trehalosa suprimía la agregación de las células madre de mamífero y suprimía una reducción en la tasa de supervivencia (solicitud de patente japonesa No. 2010-251273). Las posibles causas de la formación de la embolia pulmonar mediante el trasplante de células madre incluyen que las masas de células en cada una de las cuales las células madre están agregadas obstruyen los vasos sanguíneos capilares de la arteria pulmonar; sin embargo, sólo se ha pensado en la simple inhibición de la agregación de células para no inhibir la formación de la embolia pulmonar por las células madre, ya que mientras que el tamaño de las células madre, por ejemplo, células madre mesenquimales (MSC), es de 10 a 50 µm, el diámetro interior de los vasos sanguíneos capilares de la arteria pulmonar es de 10 µm, es decir, el tamaño de las MSC es mayor que el de los vasos sanguíneos capilares de la arteria pulmonar. Los presentes inventores han encontrado que cuando las MSC se suspenden en una solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa y se administra MSC suspendidas en la solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa por vía intravenosa a ratas, no se observa una reducción en la presión parcial de oxígeno en sangre durante o después de la administración y la acumulación de las poblaciones de MSC en el pulmón se reduce en comparación con la de la utilización de una solución de lactato de Ringer sin trehalosa o una solución salina fisiológica como control en forma de suspensión, logrando así la presente invención.

[0011] De este modo, la presente invención se refiere a: (1) trehalosa o sus derivados o una sal de los mismos para utilizar en la prevención de la formación de la embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión; (2) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según el punto (1) anterior, en la que las células de mamífero son células madre de mamífero; (3) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según el punto (2) anterior, en la que las células madre de mamífero son células madre mesenquimales de mamífero o células madre pluripotentes de mamífero; (4) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, en la que las células de mamífero comprenden las células de mamífero en un estado unicelular; y (5) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores, en la que la trehalosa o su derivado, o una sal de los mismos, tienen una concentración que varía de 0,1 a 20%.

[0012] La presente invención también se refiere a: (6) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en una suspensión de células de mamífero como un agente preventivo contra la formación de la embolia pulmonar durante la administración de las células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión; (7) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según el punto (6) anterior, en la que las células de mamífero son células madre de mamífero; y (8) trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar según el punto (7) anterior, en la que las células madre de mamífero son células madre mesenquimales de mamífero o células madre pluripotentes de mamífero.

[0013] La presente descripción se refiere además a: (9) la utilización de trehalosa o su derivado, o una sal de los mismos, en la preparación de un agente preventivo contra la formación de la embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo; y (10) la utilización según el punto (9) anterior, en la que las células de mamífero son células madre de mamífero.

15 Efecto de la invención

[0014] Según la presente invención, se puede disminuir el riesgo de formación de embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero, tales como células madre de mamífero, a través de un vaso sanguíneo y se puede reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad embólica pulmonar.

20 Breve descripción de los dibujos

[0015]

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de medición de la presión parcial de oxígeno en sangre (pO_2) en ratas a las que se administró cada uno de 3 tipos de suspensiones de MSC (MSC suspendidas en solución salina fisiológica [... ▲ ...], MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer [... ● ...] y MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa [-■-]). El eje vertical representa la presión parcial de oxígeno en sangre. La presión parcial de oxígeno en sangre se expresa como un valor relativo cuando se supone ésta antes de la administración de MSC (minuto 0) como 1. El eje horizontal representa el tiempo después del inicio de la administración de la suspensión de MSC.

[Figura 2] La figura 2 es una fotografía que muestra los resultados de análisis de imagen de la biodistribución de MSC en ratas a las que se administró cada uno de 3 tipos de suspensiones de MSC (MSC suspendidas en solución salina fisiológica, MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer y MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa) (a la izquierda, centro y derecha, respectivamente, en la figura).

35 Modo de realización de la invención

[0016] La suspensión de células de mamífero utilizada según la presente invención no está particularmente limitada siempre que se trate de una suspensión que comprenda células de mamífero, tales como células madre de mamífero, y la trehalosa o su derivado, o una sal de los mismos (en lo sucesivo referidos como trehalosa). El agente preventivo contra la formación de la embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero, tales como células madre de mamífero, a través de un vaso sanguíneo según la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea una composición que comprende una trehalosa como principio activo. Entre los ejemplos de mamífero se pueden incluir roedores, tales como ratones, ratas, hamsters y cobayas, lagomorfos, tales como conejos, ungulados, tales como cerdos, vacas, cabras, caballos y ovejas, carnívoros, tales como perros y gatos y primates tales como seres humanos, monos, mono rhesus, mono cynomolgus, monos tití, orangutanes, y chimpancés; entre otros, se pueden ejemplificar preferiblemente ratones, cerdos y seres humanos. Entre los ejemplos de células de mamífero se pueden incluir células de los islotes pancreáticos de mamífero administrados por vía intravenosa a pacientes con diabetes de tipo I, y células dendríticas de mamífero, células asesinas naturales, células T alfa/beta ($\alpha\beta$), células T gamma/delta ($\gamma\delta$), y linfocitos T citotóxicos (CTL) administrados por vía intravenosa a pacientes de cáncer, además de células madre de mamífero administradas a través de un vaso sanguíneo para medicina regenerativa o similares.

[0017] La "célula madre" significa una célula inmadura que tiene un potencial de auto-renovación y un potencial de diferenciación/proliferación. Las células madre incluyen subpoblaciones, tales como células madre pluripotentes, células madre multipotentes y células madre unipotentes, según la capacidad de diferenciación. La célula madre pluripotente significa una célula que, como tal, no puede convertirse en un organismo individual, pero tiene la capacidad de diferenciarse en todos los tejidos o células que constituyen un cuerpo vivo. La célula madre multipotente significa una célula que tiene la capacidad de diferenciarse en una pluralidad de, pero no todos, los tipos de tejidos o células. La célula madre unipotente significa una célula que tiene la capacidad de diferenciarse en un tejido o célula particular.

[0018] Entre los ejemplos de células madre pluripotentes se incluyen una célula madre embrionaria (célula ES), una célula EG y una célula iPS. Las células ES pueden producirse mediante el cultivo de una masa celular interna en células de alimentación o en un medio que contiene LIF. Las células EG pueden producirse mediante el cultivo de células germinales primordiales en un medio que contiene mSCF, LIF y bFGF (Cell, 70: 841-847, 1992). Las células

5 iPS se pueden producir mediante la introducción de factores de reprogramación, tales como Oct3/4, Sox2 y Klf4 (y opcionalmente adicionalmente c-Myc o n-Myc) en células somáticas (por ejemplo, fibroblastos o células de la piel) (Cell, 126: pág. 663-676, 2006; Nature, 448: pág. 313-317, 2007; Nat Biotechnol, 26; pág. 101-106, 2008; Cell 131: pág. 861-872, 2007; Science, 318: pág. 1917-1920, 2007; Cell Stem Cells 1: pág. 55-70, 2007; Nat Biotechnol., 25: pág. 1177-1181, 2007; Nature, 448: pág. 318-324, 2007; Cell Stem Cells 2: pág. 10-12, 2008; Nature 451: pág. 141-146, 2008; Science, 318: pág. 1917-1920, 2007).

10 **[0019]** Entre los ejemplos de células madre multipotentes se incluyen células madre somáticas, incluyendo una célula madre mesenquimal capaz de diferenciarse en células, tales como un adipocito, un osteocito, un condrocito, y un adipocito, un progenitor hematopoyético capaz de diferenciarse en células de la sangre, tales como un leucocito, un eritrocito, y una plaqueta, una célula madre neural capaz de diferenciarse en células, tales como una neurona, un astrocito, y un oligodendrocito, una célula madre mieloide, y una célula madre germinal. La célula madre multipotente es preferiblemente una célula madre mesenquimal. La célula madre mesenquimal significa una célula madre capaz de diferenciarse en todos o alguno de un osteoblasto, un condroblasto y un lipoblasto. Las células madre funcionales pueden aislarse de un cuerpo vivo mediante procedimientos conocidos per se. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden obtener de la médula ósea de mamíferos, tejido graso, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, y similares, mediante procedimientos generales bien conocidos. Por ejemplo, las células madre mesenquimales humanas pueden aislarse mediante el cultivo y subcultivo de células madre hematopoyéticas o similares después de la punción de la médula ósea (Journal of Autoimmunity, 30 (2008) 163-171). Las células madre multipotentes también se pueden obtener mediante el cultivo de las células madre pluripotentes descritas anteriormente bajo condiciones de inducción adecuadas.

25 **[0020]** Las células, tales como células madre, contenidas en la suspensión de células de mamífero de la presente descripción pueden ejemplificarse por células adherentes. Aunque las células adherentes se agregan fácilmente en una suspensión, la agregación se puede suprimir de manera efectiva debido a que una trehalosa está contenida en la suspensión de la presente descripción. Tal como se utiliza en este documento, la célula "adherente" significa una célula dependiente de andamiaje ("scaffold") capaz de sobrevivir, proliferar y producir sustancias mediante la adhesión al andamiaje. Los ejemplos de la célula madre adherente pueden incluir una célula madre pluripotente, una célula madre mesenquimal, una célula madre neural, una célula madre mieloide y una célula madre germinal. La célula madre adherente es preferiblemente una célula madre mesenquimal o una célula madre pluripotente.

35 **[0021]** La célula de mamífero puede ser una célula separada de un cuerpo vivo o una célula subcultivada in vitro. Las células de mamífero (población) contenidas en la suspensión de células de mamífero de la presente descripción son preferiblemente aquellas aisladas o purificadas. Tal como se utiliza en el presente documento, "aislada o purificada" significa que se ha aplicado la operación de eliminación de componentes distintos de un componente deseado. La pureza de las células de mamífero aisladas o purificadas (el porcentaje de células deseadas, tales como el número de células madre de mamífero en relación con el número de todas las células) es habitualmente del 30% o más, preferiblemente del 50% o más, más preferiblemente del 70% o más, aún más preferiblemente del 90% o más (por ejemplo, 100%).

40 **[0022]** Las células de mamífero (población) contenidas en la suspensión de la presente descripción comprenden preferiblemente las células de mamífero en un estado unicelular. Tal como se utiliza en el presente documento, el "estado de célula individual" significa que las células no se agrupan para formar una masa (en otras palabras, un estado no agregado). Las células de mamífero en un estado unicelular se pueden preparar sometiendo las células de mamífero cultivadas in vitro a un tratamiento enzimático con tripsina/EDTA o similares. El porcentaje de las células de mamífero en un estado unicelular en las células de mamífero es habitualmente del 70% o más, preferiblemente del 90% o más, más preferiblemente del 95% o más, aún más preferiblemente del 99% o más (por ejemplo, 100%). El porcentaje de las células en un estado unicelular se puede determinar mediante la dispersión de las células de mamífero en PBS, la observación de la dispersión en un microscopio y el examen de la presencia de agregación en una pluralidad (por ejemplo, 1000) de las células seleccionadas al azar.

55 **[0023]** Las células de mamífero están flotando preferiblemente en la suspensión de la presente descripción. Tal como se utiliza en este documento, "flotando" se refiere a que las células se mantienen en una suspensión sin ponerse en contacto con la pared interior de un recipiente que aloja la suspensión.

60 **[0024]** Entre los ejemplos de trehalosa en las trehalosas usadas en la presente invención se pueden incluir α,β -trehalosa como un disacárido en el que las moléculas de α -glucosa y β -glucosa están unidas en forma de 1,1-glucósido y β,β -trehalosa en la que dos moléculas de β -glucosa están unidas en forma de 1,1-glucósido, además de α,α -trehalosa como un disacárido en el que dos moléculas de α -glucosa están unidas en forma de 1,1-glucósido; entre otras, la α,α -trehalosa es preferible. Estas trehalosas se pueden producir mediante cualquier procedimiento bien conocido, tal como síntesis química, producción por un microorganismo y producción por una enzima; sin embargo, también se pueden utilizar las disponibles comercialmente. Ejemplos de las mismas pueden incluir α,α -Trehalosa (de Hayashibara Shoji Co., Ltd.) y α,α -Trehalosa (de Wako Pure Chemical Industries Ltd.).

[0025] El derivado de trehalosa en las trehalosas usadas en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea una glicosiltrehalosa en la que una o más unidades de azúcar están unidas a trehalosa como un disacárido; las glicosiltrehalosas incluyen glucosiltrehalosa, maltosiltrehalosa y maltotriosiltrehalosa.

5 **[0026]** Entre los ejemplos de la sal de trehalosa o su derivado en las trehalosas usadas en la presente invención se pueden incluir sales de adición de ácido, tales como clorhidratos, bromhidratos, yodhidratos, fosfatos, nitratos, sulfatos, acetatos, propionatos, toluenosulfonatos, succinatos, oxalatos, lactatos, tartratos, glicolatos, metanosulfonatos, butiratos, valeratos, citratos, fumaratos, maleatos, y malatos; sales metálicas, tales como sales de sodio, sales de potasio y sales de calcio; y sales de amonio y sales de alquilamonio. Estas sales se utilizan cada una
10 en forma de una solución en el momento de uso, y su acción tiene preferiblemente la misma potencia que la de trehalosa. Estas sales pueden formar hidratos o solvatos y se pueden utilizar solas o en una combinación adecuada de 2 o más de las mismas.

15 **[0027]** La concentración de una trehalosa aplicada a la suspensión de células de mamífero y el agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar, según la presente invención, puede ser una concentración capaz de prevenir la formación de una embolia pulmonar por células, tales como células madre, y se puede seleccionar adecuadamente dependiendo del número y la concentración de células en suspensión; sin embargo, se prefiere una concentración suficiente para suprimir la agregación y la reducción de la tasa de supervivencia de células de mamífero. Una concentración más alta de una trehalosa aumenta el efecto de prevenir la formación de la embolia
20 pulmonar, así como el efecto de suprimir la reducción de la agregación y la reducción de la tasa de supervivencia; sin embargo, una concentración excesivamente alta de una trehalosa tiene la posibilidad de afectar negativamente a la tasa de supervivencia de las células. Por ejemplo, la concentración de una trehalosa aplicada a la suspensión de células de mamífero y el agente preventivo contra la formación de la embolia pulmonar, según la presente invención, es habitualmente del 0,1% o más, preferiblemente del 0,5% o más, más preferiblemente del
25 1,0% o más, y habitualmente del 20 % o menos, preferiblemente del 15% o menos, más preferiblemente del 5,0% o menos, en vista de evitar el efecto adverso sobre la tasa de supervivencia de las células madre. De este modo, la concentración de una trehalosa en la suspensión es del 0,1 al 20%, preferiblemente del 0,5 al 15%, más preferiblemente del 1,0 al 5,0%.

30 **[0028]** En la presente invención, la "formación de una embolia pulmonar" en la administración a través de un vaso sanguíneo significa que células de mamífero trasplantadas (administradas) por vía intraarterial o intravenosa forman un estado de obstrucción del sistema arterial periférico del pulmón, por ejemplo, uno o más de los vasos sanguíneos capilares de la arteria pulmonar. El "estado de obstrucción" del sistema arterial periférico del pulmón no requiere necesariamente la parada de las células en el sistema arterial periférico del pulmón, y sólo requiere la obstrucción
35 del flujo de sangre en el punto en cuestión. El flujo de sangre aquí no tiene que detenerse por completo, y es suficiente si se produce una reducción en el flujo de sangre en un grado que cause una función pulmonar reducida en un sentido amplio. La "función pulmonar" significa principalmente la absorción de oxígeno del aire en la sangre; sin embargo, también abarca la excreción de dióxido de carbono y otros gases. La aparición de la formación de una embolia pulmonar por las células reduce el flujo de sangre en los vasos sanguíneos capilares de una arteria pulmonar, y causa taquipnea (aumento de la ritmo de respiración) y taquicardia (aumento del ritmo cardíaco), aumenta la presión sanguínea, tal como la presión arterial pulmonar, o disminuye la presión parcial del oxígeno en
40 sangre. De este modo, la prevención de la formación de una embolia pulmonar debido a ltrasplante de células puede reducir riesgos, tales como taquipnea, taquicardia, aumento de la presión sanguínea y disminución de la presión parcial de oxígeno en sangre, debido a la embolia pulmonar. En algunos casos, la formación de una embolia pulmonar debido al trasplante de células da lugar al desarrollo de enfermedades embólicas pulmonares, tales como una reducción en la función pulmonar y una reducción en la función cardíaca (tal como la función de mover la sangre al interior de las arterias o una función cardíaca de mover la sangre hacia el exterior de las venas). Además, la formación de una embolia pulmonar según la presente invención también abarca el caso en el que las células de mamíferos forman un estado de obstrucción del sistema arterial periférico del pulmón, así como otros vasos
45 sanguíneos.

[0029] En la suspensión de células de mamífero de la presente descripción, las células de mamífero se suspenden habitualmente en una solución acuosa fisiológica que comprende una trehalosa como principio activo. Por otra parte, el agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar según la presente descripción se clasifica
55 aproximadamente en una forma líquida y una forma no líquida. El agente preventivo en forma líquida se compone habitualmente en forma de una solución acuosa fisiológica que comprende una trehalosa como principio activo, y las células de mamífero pueden suspenderse en el agente preventivo en forma líquida para preparar una suspensión de células de mamífero de la presente descripción. El agente preventivo no líquido se compone habitualmente en forma de un material que contiene una trehalosa, tal como polvo, que se añade a una solución acuosa fisiológica en la que están suspendidas las células de mamífero, y el agente preventivo no líquido se puede añadir a la solución acuosa fisiológica en la que están suspendidas las células de mamífero para preparar una suspensión de células de mamífero de la presente descripción.

60 **[0030]** Además, los diferentes aspectos de la suspensión de células de mamífero de la presente descripción pueden incluir un procedimiento para prevenir la formación de una embolia pulmonar en el trasplante de células, tales como células madre, en el que se administra una suspensión de células de mamífero que comprende células de mamífero

y una trehalosa a través de un vaso sanguíneo, y los diferentes aspectos del agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar según la presente descripción pueden incluir el uso de una trehalosa en la preparación de un agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo.

5 [0031] Entre los ejemplos de la solución acuosa fisiológica se pueden incluir solución salina fisiológica, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución salina fisiológica tamponada con Tris, solución salina fisiológica tamponada con HEPES, soluciones de Ringer (solución de lactato de Ringer, solución de acetato de Ringer, solución de bicarbonato de Ringer, y similares), solución acuosa de glucosa al 5%, medios líquidos para el cultivo de mamífero y soluciones acuosas isotónicas, tales como soluciones acuosas de agentes isotónicos (glucosa, D-sorbitol, D-manitol, lactosa, cloruro de sodio y similares); entre otros, se prefiere una solución de Ringer, más preferiblemente solución de lactato de Ringer, solución de acetato de Ringer o solución de bicarbonato de Ringer, todavía más preferiblemente solución de lactato de Ringer. Tal como se usa en el presente documento, "isotónico" significa que tiene una presión osmótica que va desde 250 hasta 380 mOsm/l. La solución acuosa fisiológica puede contener además un estabilizante (por ejemplo, albúmina de suero humano o polietilenglicol), un tampón (por ejemplo, tampón fosfato o tampón de acetato sódico), un agente quelante (por ejemplo, EDTA, EGTA, ácido cítrico o salicilato), un solubilizante, un conservante, un antioxidante, y similares.

20 [0032] Se puede utilizar una trehalosa en combinación con un dextrano, que se ha demostrado que tiene un efecto preventivo contra la formación de una embolia pulmonar como la trehalosa por los presentes inventores. En lugar de una trehalosa o junto con una trehalosa también se puede utilizar maltosa, glucosa, sacarosa, lactosa, alosa, galactosa, sorbitol, xilitol, dextrina, ciclodextrina, o similares, que se espera que puedan tener un efecto preventivo contra la formación de una embolia pulmonar como la trehalosa.

25 [0033] Las células, tales como células madre, contenidas en la suspensión de células de la presente descripción están presentes en un estado flotante, y las células en un estado flotante en general se agregan fácilmente; sin embargo, el efecto de una trehalosa de la presente invención suprime la agregación de células y se puede mantener un estado de una célula individual durante un largo período de tiempo.

30 [0034] La suspensión de células de mamífero en una solución acuosa fisiológica que contiene una trehalosa puede llevarse a cabo mediante un procedimiento bien conocido en la técnica, tales como el pipeteo o golpeteo. La temperatura de la suspensión de células de mamífero de la presente descripción está habitualmente en el intervalo de 0 a 37°C, preferiblemente de 0 a 25°C. La densidad de células de mamífero en la suspensión de la presente descripción puede ser una densidad capaz de prevenir la formación de una embolia pulmonar por células, tales como células madre; sin embargo, es preferiblemente una densidad a la que se consigue el efecto de suprimir la agregación de células de mamífero y una reducción en la tasa de supervivencia de las mismas por una trehalosa, y está habitualmente en el intervalo de 10^3 a 10^{10} células/ml.

40 [0035] La suspensión de células de mamífero de la presente descripción suprime la agregación de células de mamífero por una trehalosa; de este modo, el trasplante de células puede llevarse a cabo usando esto para reducir el riesgo de que una cánula se obstruya con un agregado celular. La suspensión de células de mamífero de la presente descripción suprime una reducción en la tasa de supervivencia de células de mamífero en la suspensión por una trehalosa; de este modo, el uso de la suspensión de la presente descripción permite el trasplante de células utilizando células en un mejor estado y se puede esperar que den lugar a una mejora de un efecto terapéutico.

45 [0036] La suspensión de células de mamífero o el agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar según la presente descripción se pueden producir en forma de una formulación en suspensión de células de mamífero o una formulación preventiva contra la formación de una embolia pulmonar mediante su alojamiento en un recipiente estéril adecuado. Entre los ejemplos del recipiente se pueden incluir botellas, viales, jeringas, bolsas de plástico, tales como una bolsa de solución de infusión, y tubos de ensayo. Estos recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales, tales como vidrio y plástico. Se puede conectar una cánula y/o una aguja de inyección al recipiente para una formulación de suspensión de células de mamífero de modo que la suspensión de células de mamífero de la presente descripción en el recipiente se puede infundir en un paciente.

55 [0037] La presente invención se describirá más específicamente a continuación con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance técnico de la presente invención.

Ejemplos

60 Ejemplo 1

1. Confirmación de que la solución para la suspensión de células madre de la presente descripción se puede utilizar para la prevención de la formación de una embolia pulmonar por células madre

65 1-1 Procedimiento

1-1-1 Preparación de una suspensión de MSC utilizada para la administración intravenosa a rata

[0038]

[1] Se separaron MSC derivadas de la grasa de ratas hembra Lew/SsN Slc mediante tratamiento de digestión con tripsina, seguido de centrifugación a 200 X g durante 3 minutos para recuperar las células.

[2] Se prepararon las MSC a una concentración de 2×10^6 células/ml usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) (de Invitrogen Co., Ltd.), seguido por la dispensación de 1×10^7 células (5 ml) en 3 tubos, a cada uno de los cuales se añadieron 13 μ l de 8,3 mg/ml de reactivo fluorescente Xenolight DiR (de Caliper Co., Ltd., Producto N° 125964), para marcar las MSC a 37°C durante 30 minutos.

[3] Después de extraer la solución de marcaje por centrifugación a 200 X g durante 3 minutos, se añadieron 5 ml de D-PBS, y se realizó de nuevo la centrifugación a 200 X g durante 3 minutos para eliminar el sobrenadante. Las células precipitadas se suspendieron hasta una concentración de MSC de 2×10^6 células/ml en una solución salina fisiológica ("Otsuka Normal Saline" de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), una solución de lactato de Ringer ("Lactec Injection" de Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), y una solución de lactato de Ringer que contenía trehalosa al 3% (30 mg/ml) (de Wako Pure Chemical Industries Ltd) para preparar una MSC suspendidas en solución salina fisiológica, MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer y MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contenía trehalosa, respectivamente.

1-1-2 Administración intravenosa de una suspensión de MSC a rata

[0039]

[1] Se utilizaron ratas hembra Lew/SsN Slc de 10 semanas de vida. Las ratas se sometieron a ayuno de 24 horas antes de la administración de cada suspensión de MSC.

[2] Para asegurar una vía de administración a las ratas, las ratas se restringieron cada una en un retenedor, y se insertó una aguja permanente 24G SurFlo en la vena de la cola.

[3] Se administró rápidamente Somnopentilo (50 mg/kg) (de Kyoritsu Seiyaku Corporation) en la vena de la cola para el tratamiento anestésico. Para la anestesia de mantenimiento, 1 hora más tarde se administraron adicionalmente 25 mg/kg de Somnopentilo (de Kyoritsu Seiyaku Corporation).

[4] Para evitar la coagulación de la sangre, se administraron 100 UI/kg de heparina (de Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.) a través de una vía de administración en la vena de la cola.

[5] La arteria carótida izquierda se expuso mediante incisión cervical y se insertó/fijó un tubo de cloruro de polivinilo.

[6] La temperatura corporal se mantuvo a 37°C utilizando un controlador de la temperatura corporal (se insertó una sonda de temperatura rectal de Neuroscience, Inc. en 3,5 cm).

[7] La intubación endotraqueal se realizó utilizando una aguja permanente de plástico 16G y el extremo no insertado de la aguja permanente se conectó a un respirador para el control de la respiración artificial (ventilación con aire, cantidad de ventilación: 10 ml/kg/respiración y la frecuencia de ventilación: aproximadamente 70 respiraciones/minuto).

[8] Para evitar la aparición de la respiración espontánea, se administró un relajante muscular (2 o 4 mg/kg Mioblock Intravenous Injection de MSD K.K.) a través de una vía de administración en la vena de la cola.

[9] Para medir la presión de gas en sangre (presión parcial de oxígeno [pO₂] y la presión parcial de dióxido de carbono) (mm Hg) antes de la administración de la suspensión de MSC, se recogieron 300 μ l de sangre a través de un tubo en la arteria carótida.

[10] Los 3 tipos de suspensiones de MSC preparadas mediante el procedimiento descrito en en punto anterior "Preparación de una suspensión de MSC utilizada para la administración intravenosa a rata" (MSC suspendidas en solución salina fisiológica, MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer y MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa) se administraron cada uno durante 40 minutos a ratas a través de la vena de la cola. Los grupos de ratas en los que se administró cada uno intravenosamente las MSC suspendidas en solución salina fisiológica, MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer y MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa se definieron como un grupo de administración de MSC suspendidas en solución salina fisiológica (n = 4), un grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer (n = 4) y un grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa (n = 4), respectivamente.

1-1-3 Análisis de la presión parcial de oxígeno en sangre y análisis de imágenes de MSC en rata a la que se administró la suspensión de MSC

[0040]

[1] Se recogió sangre (300 μ l) a través de un tubo a la arteria carótida cada 10 minutos hasta 60 minutos después de la administración de la suspensión de MSC y se midió la presión de gases en sangre (presión parcial de oxígeno [pO₂] y la presión parcial de dióxido de carbono) (mm Hg) usando Chiron 348 (de Siemens AG).

Como control, se utilizó la sangre recogida antes de la administración de las suspensiones de MSC preparadas en la etapa [8] del punto anterior "Administración intravenosa de una suspensión de MSC a rata".

[2] El sangrado se realizó a través de la arteria carótida después de un lapso de 60 minutos desde la administración de la suspensión de MSC para la eutanasia.

[3] Se extrajo el pulmón, y se midieron la fluorescencia y la intensidad de emisión mediante análisis de imagen

usando IVIS Spectrum (de Caliper Life Sciences Inc.) (longitud de onda de excitación: 710 nm, longitud de onda de absorción: 780 nm).

1-2 Resultado

5 1-2-1 Análisis de la presión parcial de oxígeno en sangre en rata a la que se administró la suspensión de MSC

10 **[0041]** Cuando se utilizaron la solución salina fisiológica y la solución de lactato de Ringer como solución para la suspensión de MSC, se observó una reducción en la presión parcial de oxígeno en la sangre desde el inicio de la administración de la suspensión de MSC, y se observó que la presión parcial de oxígeno en sangre se había reducido al menos hasta un punto de tiempo cuando habían transcurrido 20 minutos desde el final de la administración (60 minutos después de la administración) (Figura 1, Tabla 1). Por otra parte, cuando se utilizó la solución de lactato de Ringer que contenía trehalosa como solución para la suspensión de MSC, no se observó reducción en la presión parcial de oxígeno en sangre durante la administración (0 a 40 minutos después del inicio de la administración) y durante al menos 20 minutos después de la administración (40 a 60 minutos después del inicio de la administración) (Figura 1, Tabla 1). A partir de estos resultados, es probable que, mientras que la administración (trasplante) de MSC suspendidas en la solución libre de trehalosa (la solución salina fisiológica o la solución de lactato de Ringer) causaba la formación de la embolia pulmonar, la administración (trasplante) de MSC suspendidas en la solución de lactato de Ringer que contenía trehalosa daba lugar a la prevención de la formación de embolia pulmonar.

[Tabla 1]

Promedio		0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
pO ₂	Grupo de administración de MSC suspendidas en solución salina fisiológica	1	0,827	0,804	0,785	0,790	0,825	0,901
	Grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer	1	0,810	0,755	0,727	0,718	0,731	0,816
	Grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa	1	1,118	1,067	1,075	1,034	1,070	1,105

25 Las presiones parciales de oxígeno en la sangre (pO₂) en la tabla se expresan como valores relativos cuando aquellas en la sangre recogida antes de la administración de las suspensiones de MSC (minuto 0) se asumen cada una como 1. Cada valor representa el valor promedio de los resultados de 4 experimentos independientes.

30 1-2-2 Análisis de imágenes de MSC en rata a la que se administró la suspensión de MSC

35 **[0042]** Cuando se examinó la biodistribución de MSC después de la administración de las mismas a cada cuerpo vivo de rata mediante análisis de imagen, se observó que el uso de la solución salina fisiológica como una solución para suspender MSC daba como resultado la mayor cantidad de fluorescencia derivada de MSC en el pulmón (Figura 2, Tabla 2). Por otro lado, el uso de la solución de lactato de Ringer que contenía trehalosa como una solución para suspender MSC dio lugar a la menor cantidad de fluorescencia derivada de MSC, y se observó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el uso de la solución salina fisiológica ($p < 0,05$ mediante el test de Tukey) (Figura 2, Tabla 2). Estos resultados muestran que mientras que la administración (trasplante) de MSC suspendidas en la solución libre de trehalosa (la solución salina fisiológica o la solución de lactato de Ringer) daba lugar a la acumulación de MSC en el pulmón, particularmente los vasos sanguíneos capilares del pulmón, la administración (trasplante) de MSC suspendidas en la solución que contenía trehalosa (solución de lactato de Ringer) daba lugar a la reducción de la acumulación de MSC en el pulmón, particularmente los vasos sanguíneos capilares del pulmón.

[Tabla 2]

45

	Eficacia de la radiación total relativa (solución salina = 100%)	Desviación estándar de la eficacia de la radiación total relativa (solución salina = 100%)
Grupo de administración de MSC suspendidas en solución salina fisiológica	100,0%	0,0%

Grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer	85,2%	9,4%
Grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa	62,1%	8,0%

5 Test de Tukey: $p < 0,05$ (grupo de administración de MSC suspendidas en solución salina fisiológica frente al grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa); $P = 0,1477$ (grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer frente al grupo de administración de MSC suspendidas en solución de lactato de Ringer que contiene trehalosa). Cada valor en la tabla representa el valor promedio de los resultados de 4 experimentos independientes.

10 **[0043]** A partir de los 2 resultados anteriores, es probable que el trasplante de MSC usando una solución libre de trehalosa dé lugar a la formación de una embolia pulmonar por la acumulación de MSC en el pulmón, particularmente los vasos sanguíneos capilares del pulmón, reduzca la capacidad de absorción de oxígeno en el punto en cuestión y disminuya la presión parcial de oxígeno en sangre. Por otra parte, es probable que el trasplante de MSC usando una solución que contiene trehalosa dé lugar a la supresión de la acumulación de MSC en el pulmón (formación de embolia pulmonar), no reduzca la capacidad del pulmón para absorber oxígeno y no disminuya la presión parcial de oxígeno en sangre.

15 **Aplicabilidad Industrial**

20 **[0044]** La presente invención permite la prevención de la formación de una embolia pulmonar en el trasplante de células, tales como células madre (por ejemplo, MSC), y la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad embólica pulmonar y, por lo tanto, es útil en el campo del trasplante médico en medicina regenerativa o similar, y el campo del tratamiento del cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en la prevención de la formación de una embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión.
2. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según la reivindicación 1, en los que las células de mamífero son células madre de mamífero.
- 10 3. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según la reivindicación 2, en los que las células madre de mamífero son células madre mesenquimales de mamífero o células madre pluripotentes de mamífero.
4. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que las células de mamífero comprenden las células de mamífero en un estado unicelular.
- 15 5. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar en una suspensión de células de mamífero como un agente preventivo contra la formación de una embolia pulmonar durante la administración de células de mamífero a través de un vaso sanguíneo como una suspensión.
- 20 6. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según la reivindicación 5, en los que las células de mamífero son células madre de mamífero.
7. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según la reivindicación 6, en los que las células madre de mamífero son células madre mesenquimales de mamífero o células madre pluripotentes de mamífero.
- 25 8. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en los que las células de mamífero comprenden las células de mamífero en un estado unicelular.
- 30 9. Trehalosa o sus derivados, o una sal de los mismos, para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en los que la trehalosa o sus derivados, o la sal de los mismos, tienen una concentración que varía del 0,1 al 20%.

Figura 1

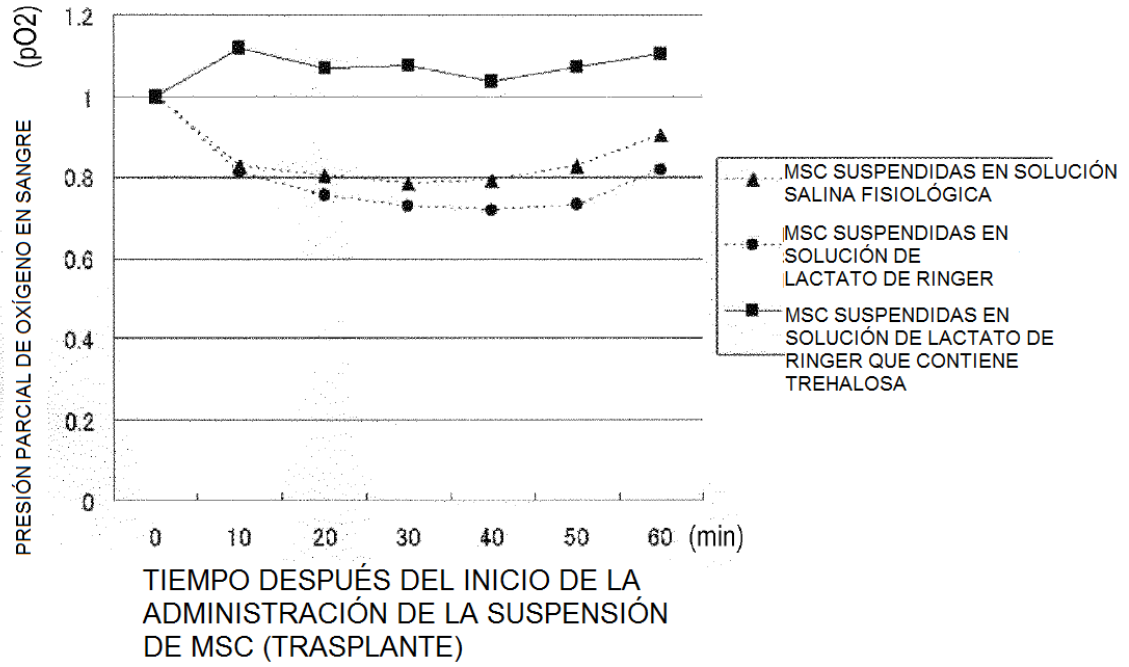


Figura 2

