

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 535**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 17150455 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 3176255**

54 Título: **Uso de células madre del estroma derivadas del tejido adiposo en el tratamiento de fístula**

30 Prioridad:

24.06.2005 US 167061

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

16.01.2019

73 Titular/es:

TIGENIX, S.A.U. (50.0%)
C/ Marconi, 1, Parque Tecnológico de Madrid
28760 Tres Cantos (Madrid), ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)

72 Inventor/es:

FERNÁNDEZ MIGUEL, MARÍA GEMA;
GONZÁLEZ DE LA PENNA, MANUEL ÁNGEL;
GARCÍA CASTRO, ROSA ANA;
GARCÍA ARRANZ, MARIANO y
GARCÍA OLMO, DAMIÁN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 696 535 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

Uso de células madre del estroma derivadas del tejido adiposo en el tratamiento de fístula

5 **Antecedentes de la Invención**

10 Generalmente, una fístula es una conexión anormal o pasadizo entre órganos o vasos que normalmente no se conectan. Las fístulas pueden desarrollarse en varias partes del cuerpo. Por ejemplo, los tipos de fístulas, nombrados por las áreas del cuerpo en el que ocurren, incluyen la fístula anorrectal o fístula anal o fístula fecal (entre el recto u otra área anorrectal y la superficie de la piel), fístula arteriovenosa o fístula AV (entre una arteria y una vena), fístula biliar (entre los conductos de bilis y la superficie de la piel, a menudo causada por la cirugía de la vesícula biliar), fístula cervical (apertura anormal en la cerviz), fístula craneosinusal (entre el espacio intracraneal y un seno paranasal), fístula enteroentérica (entre dos partes del intestino), fístula enterocutánea (entre el intestino y la superficie de la piel, en particular desde el duodeno o el yeyuno o el ileon), fístula enterovaginal (entre el intestino y la vagina), fístula gástrica (entre el estómago y la superficie de la piel), fístula metroperitoneal (entre la cavidad del útero y la cavidad peritoneal), fístula perilinfática (una rotura entre las membranas entre el oído medio y el interno), fístula arteriovenosa pulmonar (entre una arteria y una vena de los pulmones, resultando en un desvío de sangre), fístula rectovaginal (entre el recto y la vagina), fístula umbilical (entre el ombligo y el intestino), fístula traqueoesofágica (entre los tubos utilizados al respirar y al comer) y fístula véscicovaginal (entre la vejiga y la vagina). Las causas de fístulas incluyen trauma, complicaciones de un tratamiento médico y enfermedad.

25 El tratamiento para las fístulas varía dependiendo de la causa y la amplitud de la fístula, pero generalmente requiere intervención quirúrgica. Varios procedimientos quirúrgicos son comúnmente utilizados, más comúnmente la fistulotomía, la colocación de un setón de drenaje (una cuerda que es pasada por el trayecto de la fístula para mantenerla abierta para drenar), o un procedimiento endorrectal de la solapa (donde el tejido saludable es tirado sobre el lado interno de la fístula para evitar que las heces u otro material reinfecten el canal). La cirugía de las fístulas anorrectales no está sin efectos secundarios, incluyendo la reaparición, la reinfección y la incontinencia.

30 García-Olmo et al. (*Diseases of the Colon & Rectum*, 2005, 48(7), 1416-1423) describe la fase I de un ensayo clínico del tratamiento de la fístula de Crohn por el trasplante autólogo de células madre mesenquimales de origen adiposo.

35 García-Olmo et al. (*International Journal of Colorectal Disease*, 2003, 18(5), 451-454) describe el trasplante autólogo de células madre mesenquimales de origen adiposo para el tratamiento de la fístula rectovaginal en la enfermedad de Crohn perianal.

Lendeckel et al. (*Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2004, 32:370-373) enseña el uso de células madre derivadas de tejido adiposo autólogos para tratar defectos de calota traumáticos generalizados.

40 Las enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, son las causas principales de las fístulas anorrectales, enteroentéricas, y enterocutáneas. La incidencia de fístulas reportada en la enfermedad de Crohn oscila de 17% a 50%. El manejo de las fístulas en pacientes con la enfermedad de Crohn sigue presentando un problema sumamente desafiante debido a que muchas de esas fístulas no responden a los tratamientos disponibles. Tales fístulas y su recurrencia son una complicación muy penosa que significativamente reduce la calidad de la vida de los pacientes afectados. Las recientes mejoras en el tratamiento médico (por ejemplo, el tratamiento con Infliximab®) y el experto manejo quirúrgico han disminuido la necesidad de la cirugía complicada. No obstante, muchos pacientes no son curados. La incapacidad de las fístulas para curarse es probablemente debida a la calidad sub-óptima de los tejidos que se han visto afectados por la enfermedad de Crohn. Verdaderamente, las fístulas de Crohn proporcionan un sistema modelo para la cura de heridas en algunas de las peores condiciones posibles.

55 Otra causa principal de las fístulas es el trauma, por ejemplo, por violación, o por heridas sostenidas durante el parto, a los tejidos de la vagina y la vejiga y/o recto conducentes a la fístula rectovaginal y la fístula véscicovaginal. Todos los años, aproximadamente 100,000 mujeres a través del mundo en desarrollo sostienen tales fístulas (también conocidas como fístulas obstétricas) durante el parto obstruido. Durante el parto obstruido, la presión de la cabeza del bebé contra la pelvis de la madre corta el suministro de sangre a los tejidos delicados de la región. El tejido muerto se desprende y la mujer se queda con una fístula véscicovaginal y a veces una fístula rectovaginal. Esta apertura resulta en la incontinencia de orina y/o heces permanente. El Fondo de Población de las Naciones Unidas (FPNU) estima que la población del mundo de víctimas de fístula obstétrica es de más de dos millones. Este cálculo podría ser un subestimado significativamente. Las tasas de éxito para la reparación quirúrgica primaria oscilan del 88 al 93 por ciento pero disminuye con los atentos sucesivos. Por lo tanto, un porcentaje significativo de mujeres tienen fístulas obstétricas que no pueden ser reparadas quirúrgicamente.

65 Nuevas terapias para las fístulas son necesitadas.

Sumario de la Invención

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende células madre estromales derivadas del tejido adiposo, para su uso en el tratamiento de una fístula en un sujeto, en donde dichas células madre estromales derivadas del tejido adiposo son alogénicas con respecto al sujeto a tratar, y en donde dichas células madre estromales derivadas del tejido adiposo se preparan por un método que comprende: (a) recoger tejido adiposo de un sujeto; (b) obtener una suspensión celular por digestión enzimática; (c) sedimentar la suspensión celular y resuspender las células en un medio de cultivo; (d) cultivar las células durante por lo menos 10 días; y (e) expandir las células durante por lo menos dos pases de cultivo.

La invención también proporciona el uso de células madre estromales derivadas de tejido adiposo en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una fístula en un sujeto, en donde dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo se preparan mediante un método que comprende los pasos (a)-(e) descritos anteriormente. Realizaciones adicionales se definen en las reivindicaciones.

En la presente se divulgan, entre otras cosas, nuevas composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo descritas en la presente tienen un fenotipo distinto y muestran una mayor homogeneidad del fenotipo que las composiciones de células madre estromales derivadas de tejido adiposo descritas anteriormente, lo que las hace más adecuadas para su uso en el tratamiento de fístulas y heridas que las composiciones descritas anteriormente. Las composiciones que contienen células madre estromales derivadas de tejido adiposo pueden formularse con soluciones u otras sustancias para servir como dispositivos farmacéuticos o médicos, por ejemplo, como suturas o adhesivos. Además, se divulgan nuevos métodos para tratar fístulas y heridas usando células madre estromales derivadas de tejido adiposo, así como kits para la puesta en práctica de los mismos.

Breve Descripción de las Figuras

La FIGURA 1 representa los resultados de caracterización de las células aisladas por los métodos del Ejemplo 1 por tinción de inmunofluorescencia. La frecuencia de las células inmunopositivas es indicada como sigue: -, menos de 5%; +/-, 6-15%; +, 16-50%; ++, 51-85%; y +++, 86-100%. P, Número de Pases.

La FIGURA 2 representa la caracterización de la inmunofluorescencia indirecta de células madre estromales derivadas del tejido adiposo. Las células del paciente #001 fueron pasadas 6 células después del implante no. 6. El color azul indica el núcleo teñido de DAPI. (A) CD90; (B) c-Kit; y (C) vimentin.

La FIGURA 3 resume los resultados clínicos obtenidos utilizando ciertos métodos y composiciones de la invención. F, Femenino; M, Masculino; NI, Ningún implante; NA, No analizado.

La FIGURA 4 muestra las curvas del crecimiento de las células derivadas de lipoaspirado a diferentes concentraciones de SFB (0.5, 2.5 y 10%, como indicado). Los fibroblastos sinoviales humanos fueron cultivados en presencia de 5% o 10% de SFB. Las células número 6SD son mostradas en función de absorbencia en 595 nm. Los datos son de un experimento representativo con pocillos triplicados.

La FIGURA 5 representa la ampolla en la mucosa rectal después de que las células han sido inyectadas cerca a la apertura interna suturada.

La FIGURA 6 representa fotografías de una fístula antes (A) y ocho semanas después (B) de la inyección de las células.

La FIGURA 7A representa los histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de los marcadores de superficie (CD3, CD9, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD28, CD29, CD31, CD34, CD36, CD38, CD44, CD45, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e y CD49f) obtenidos de las células aisladas de las muestras de liposucción de un paciente implicado en el ensayo, en el pase 6.

La FIGURA 7B representa histogramas de inmunocitometría de fluorescencia correspondientes al perfil de los marcadores de superficie (CD50, CD51, CD54, CD55, CD56, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD90, CD95, CD102, CD104, CD105, CD106, CD133, CD166, glicoforina α 2, HLA I, HLA II y NGFR) obtenidos de las células aisladas de las muestras de la liposucción de un paciente implicado en el ensayo, en el pase 6.

Descripción Detallada de la Invención

1. Definiciones:

Como se utilizada en el presente, los términos y las frases siguientes contarán con las definiciones establecidas a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en el arte a la que pertenece esta invención.

5 Los artículos "un" y "una" se refieren a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. Por la manera de ejemplo, " un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

10 Por "tejido adiposo" se entiende cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón o blanco, derivado de otra región de tejido adiposo subcutáneo, omental/visceral, mamario, gonadal u otra zona de tejido adiposo. Preferiblemente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. Tales células pueden componer un cultivo celular primario o una línea de células inmortalizadas. El tejido adiposo puede ser de cualquier organismo con tejido graso. Preferentemente, el tejido adiposo es mamífero, más preferentemente el tejido adiposo es humano. Una fuente conveniente de tejido adiposo es de la cirugía de liposucción, sin embargo, la fuente del tejido adiposo o el método de aislamiento del tejido adiposo no es crítico para la invención. Si células estromales son deseadas para el trasplante autólogo en un sujeto, el tejido adiposo será aislado de ese sujeto.

15 "Células madre estromales derivadas del tejido adiposo " se refiere a células madres mesenquimales que originan del tejido adiposo.

20 El término "adhesivo" se refiere a cualquier sustancia que une o vincula superficies juntas; por ejemplo, un pegamento.

25 El término "composición celular" se refiere a una preparación de células, la preparación puede incluir, en adición a las células, componentes no celulares como los medios de cultivo celular, por ejemplo, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, co-enzima, antioxidantes, metales y similares. Además, la composición celular puede tener componentes que no afectan el crecimiento o la viabilidad del componente celular, sino que se utilizan para proporcionar a las células en un formato determinado, por ejemplo, como la matriz polimérica para la encapsulación o una preparación farmacéutica.

30 El término "cultivo" se refiere a cualquier crecimiento de células, organismos, entidades multicelulares, o tejido en un medio. El término "cultivar" se refiere a cualquier método para lograr tal crecimiento, y puede comprender múltiples pasos. El término "cultivación continua" se refiere a cultivar una célula, organismo, entidad multicelular, o tejido a una cierta fase de crecimiento, entonces utilizando otro método de cultivar para llevar dicha célula, organismo, entidad multicelular, o tejido a otra fase de crecimiento. Un "cultivo celular" se refiere a un crecimiento de células in vitro. En tal cultivo, las células proliferan, pero no se organizan en tejido per se. Un "cultivo tisular" se refiere al mantenimiento o crecimiento de tejido, por ejemplo, el explante de un órgano primordial o de un órgano adulto in vitro con el fin de preservar su arquitectura y función. Un "cultivo en monocapa" se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican en un medio adecuado mientras están adjuntas las unas a las otras y a un sustrato. Además, un "cultivo en suspensión" se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican mientras están suspendidas en un medio adecuado. Asimismo, un "cultivo de flujo continuo" se refiere al cultivo de células o explantes en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento de la célula, por ejemplo la viabilidad. El término "medios condicionados" se refiere al supernatante, por ejemplo, libre de las células o tejido cultivado, resultando después de un periodo de tiempo en contacto con las células cultivadas tanto que los medios han sido modificados a incluir ciertos factores paracrinis y/o autocrinis fabricados por las células y secretados en el cultivo. Un "cultivo confluyente" es un cultivo de células en el que todas las células están en contacto y así toda la superficie del recipiente de cultivo está cubierta, e implica que las células también han alcanzado su densidad máxima, aunque la confluencia no significa necesariamente que la división cesará o que la población no aumentará en tamaño.

50 El término "medio de cultivo" o "medio" es reconocido en el arte, y se refiere generalmente a cualquier sustancia o preparación utilizada para el cultivo de células vivas. El término "medio", como utilizado con respecto a un cultivo de célula, incluye los componentes del ambiente que rodea las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen el medio de crecimiento líquido así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento de las células. Los medios también incluyen medios gelatinosos como las matrices agar, agarosa, gelatina y colágeno. Los medios gaseosos ejemplares incluyen la fase gaseosa en la que las células, que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido, son expuestas. El término "medio" también se refiere a la materia que es destinada para uso en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. Es decir, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. Similarmente, una mezcla de polvo que al mezclarse con agua u otro líquido se convierte adecuada para el cultivo celular, puede definirse como un "medio en polvo". "Medio definido" se refiere a medios que están hechos de componentes químicamente definidos (generalmente purificados). Los "medios definidos" no contienen extractos biológicos mal caracterizados como el caldo de carne y el extracto de levadura. El "Medio rico" incluye los medios que son diseñados para favorecer el crecimiento de la mayoría o la totalidad de las formas viables de una especie en particular. Los medios ricos a menudo incluyen extractos biológicos complejos. Un "medio adecuado para el crecimiento de un cultivo de alta densidad" es cualquier medio que permite a un cultivo celular alcanzar un OD600

de 3 o más cuando otras condiciones (como la tasa de transferencia de la temperatura y el oxígeno) permiten tal crecimiento. El término "medio base" se refiere a un medio que promueve el crecimiento de muchos tipos de microorganismos que no requieren ningún tipo de suplementos nutritivos especiales. La mayoría de los medios base consisten generalmente de cuatro grupos químicos básicos: aminoácidos, carbohidratos, sales inorgánicas y vitaminas. Un medio base sirve generalmente como la base para un medio más complejo, al cual suplementos como los sueros, tampones, factores de crecimiento, lípidos, y similares son añadidos. Ejemplos de medios base incluyen, pero no son limitados a, el Medio Basal Eagle (BME), Medio Mínimo Esencial Eagle (MEM), Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Medio 199, Mezclas nutritivas F-10 de Ham y F-12 de Ham, McCoy 5A, MEM/F-1 2 por Dulbecco, R.P.M.I. 1640 y Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM).

Los términos "comprende" y "que comprende" se utilizan en el sentido inclusivo, abierto, lo que significa que elementos adicionales pueden ser incluidos.

El término "diferenciación" se refiere a la formación de células que expresan marcadores conocidos por estar asociados con células que son más especializadas y más cercanas a convertirse en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicionales. Por ejemplo, en un contexto pancreático, la diferenciación puede ser vista en la producción de grupos de célula parecidos a islotes que contienen una proporción en aumento de células beta que fabrican cantidades en aumento de insulina. Los términos "más" o la diferenciación "mayor" se refieren a células que son más especializadas y más cercanas de convertirse en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicionales que las células de las cuales fueron cultivadas. El término "diferenciación final" se refiere a células que se han convertido en células terminalmente diferenciadas incapaces de división o diferenciación adicionales.

El término "fístula" se refiere a cualquier pasadizo o comunicación o conexión anormal, generalmente entre dos órganos internos o de un órgano interno hacia la superficie del cuerpo. Ejemplos de fístulas incluyen, pero no son limitados a la, fístula anorrectal o fístula anal o fístula fecal, fístula arteriovenosa o fístula de AV, fístula biliar, fístula cervical, fístula craneosinusal, fístula enteroentérica, fístula enterocutánea, fístula enterovaginal, fístula gástrica, fístula perilinfática, fístula metropéritoneal, fístula arteriovenosa pulmonar, fístula rectovaginal, fístula umbilical, fístula traqueo-esofágica y fístula vésicovaginal.

El término "incluyendo" es utilizado en el presente para significar "incluyendo pero no limitado a". "Inclusive" e "incluyendo pero no limitado a" se utilizan de forma intercambiable.

"Marcador" se refiere a una molécula biológica cuya presencia, concentración, actividad, o estado de fosforilación puede ser discernida y utilizada para identificar el fenotipo de una célula.

Un "parche" es un apósito o cobertura aplicado para cubrir o proteger una herida u lloga.

Un "paciente", "sujeto" o "anfitrión" a ser tratados por el método sujeto puede significar un humano o un animal no humano.

La frase "farmacéuticamente aceptable" es empleada en el presente para referirse a esos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico sano, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de animales y seres humanos sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación riesgo-beneficio razonable.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como utilizada en el presente significa que un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como un líquido o masilla sólida, un diluyente, un excipiente, o un material encapsulante de disolventes, implicado en llevar o transportar el compuesto sujeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales al paciente. El término "fenotipo" se refiere a las características observables de una célula, tales como tamaño, morfología, expresión de la proteína, etc.

El término "célula progenitora" se refiere a una célula que tiene la capacidad de crear progenie que es más diferenciada de sí misma. Por ejemplo, el término se puede referir a una célula indiferenciada o célula diferenciada en una medida un poco corta de la diferenciación final que es capaz de la proliferación y da lugar a más células progenitoras que tienen la capacidad de generar un gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas distinguidas, o diferenciables. En una realización preferida, el término célula progenitora se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en distintas direcciones, por la diferenciación, por ejemplo, por adquirir caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un procedimiento complejo que ocurre típicamente a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente que a su vez se deriva de una célula multipotente, y así sucesivamente. Mientras que cada una de estas células multipotentes puede ser considerada como células madre, la gama de tipos de células que cada una puede engendrar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad para

dar origen a células de mayor potencial de desarrollo. Tal capacidad puede ser natural o puede ser inducida artificialmente durante el tratamiento con varios factores. Por esta definición, las células madre también pueden ser células progenitoras, así como también las precursoras más inmediatas a las células terminalmente diferenciadas.

5 "Proliferación" se refiere a un aumento en el número de células. "Proliferando" y la "proliferación" se refieren a las células que experimentan mitosis.

10 Como se utiliza en el presente, el término "solución" incluye un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable en el cual las células de la invención permanecen viables.

15 El término "sustancialmente puro", con respecto a las poblaciones de células madre derivadas del tejido adiposo, se refiere a una población de células madre derivadas del tejido adiposo que es por lo menos alrededor del 75%, preferiblemente al menos alrededor del 85%, más preferentemente al menos 90% y más preferentemente al menos 95% puro, con respecto a las células madres estromales derivadas del tejido adiposo que componen una población celular total. Reformulado, el término "sustancialmente puro" se refiere a una población de células estromales derivadas del tejido adiposo de la presente invención que contienen menos del 20%, más preferiblemente menos de 10%, la mayoría preferiblemente menos de un 5%, de células cometidas hacia el linaje en la población original sin amplificación y aislada antes del cultivo y la amplificación subsiguientes.

20 "Soporte" en el presente se refiere a cualquier dispositivo o material que puede servir como una fundación o matriz para el crecimiento de las células madres estromales derivadas del tejido adiposo.

25 El término "sutura" se refiere a un hilo o fibra u otro material de cierre que puede usarse para coser cerrada a una herida.

El término "tratamiento" en el presente se refiere a reparar una fístula o herida, así como para prevenir una fístula o herida de empeoramiento o recurrencia.

30 "Agente terapéutico" o "terapéutico" se refiere a un agente capaz de tener un efecto biológico en un anfitrión. Los agentes quimioterapéuticos y genotóxicos son ejemplos de agentes terapéuticos que generalmente son conocidos por ser químicos en origen, en lugar de biológicos, o por causar un efecto terapéutico mediante un mecanismo de acción particular, respectivamente. Ejemplos de agentes terapéuticos de origen biológico incluyen los factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Una variedad de agentes terapéuticos son conocidos en el arte y pueden ser identificados por sus efectos. Ciertos agentes terapéuticos son capaces de regular la diferenciación y la proliferación celular. Ejemplos incluyen los nucleótidos quimioterapéuticos, fármacos, hormonas, proteínas inespecíficas (no anticuerpo), oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que se unen a una secuencia de ácido nucleico destinataria (por ejemplo, la secuencia de ARNm)), péptidos y peptidomiméticos.

40 Una "herida" es una lesión o daño al tejido, causada por medios físicos, causando la interrupción de la continuidad normal del tejido.

2. Novedosas Composiciones de Células Madre Estromales Derivadas del Tejido Adiposo

45 En un aspecto, la invención se refiere a composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo con ciertas características, tales como un fenotipo particular. Por ejemplo, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo en una composición celular de la invención pueden caracterizarse por un marcador de superficie celular de expresión, tamaño, consumo de glucosa, producción de lactato y rendimiento celular / viabilidad. Sin embargo, otro aspecto de la presente invención se trata de composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo que incluyen, como un componente celular, preparaciones sustancialmente puras de células madre estromales derivadas del tejido adiposo que tienen un fenotipo en particular, o la progenie de la misma. Las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo de la invención presente no sólo incluyen poblaciones substancialmente puras de las células progenitoras, pero también pueden incluir componentes de cultivos celulares, por ejemplo, medios de cultivo incluyendo aminoácidos, metales, factores de coenzimas, así como pequeñas poblaciones de otras células estromales, por ejemplo, algunas de las cuales pueden surgir por la diferenciación posterior de las células de la invención. Además, otros componentes no celulares pueden incluir los que renderizan el componente celular adecuado para el soporte bajo circunstancias especiales, por ejemplo, la implantación, el cultivo continuo, o adecuado para el uso como composición farmacéutica o de biomateriales.

60 En ciertas realizaciones, las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo son producidas a través de los métodos de cultivo descritos en la Sección 4 y en la Ejemplificación.

65 En una realización, una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo es proporcionada en donde por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o preferiblemente al menos un 96%, 97%, 98% o

99% de las células madre expresan los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y/o CD105. En ciertas realizaciones de las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, menos que el 15%, 10%, 5% y preferentemente sobre 4%, 3%, 2% o 1% de las células madre expresan los marcadores CD34, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD34, CD45, CD49, CD 102, CD 104, CD 106 y/o CD 133.

En otra realización, una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo es proporcionada, en donde por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o preferiblemente al menos un 96%, 97%, 98% o 99% de las células madre expresan los marcadores c-Kit, vimentin y/o CD90. En ciertas realizaciones de las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, menos que el 15%, 10%, 5% y preferentemente sobre el 4%, 3%, 2% o el 1% de las células madre expresan los marcadores CD34, factor VIII, actina alfa, desmina, S-100 y/o queratina. También proporcionada es una población de células madres estromales derivadas del tejido adiposo que expresan los marcadores c-Kit, vimentina y CD90 y no expresan los marcadores CD34, factor VIII, actina alfa, desmina, S-100 o queratina.

La caracterización fenotípica de una población celular por los marcadores de superficie puede realizarse por la tinción individual de las células (citometría de flujo) o por el corte histológico de la población in situ, hecho de acuerdo a los métodos normales. La determinación del perfil de expresión de marcadores de superficie por anticuerpos, caracterización de inmunofenotipo, puede ser directa, utilizando un anticuerpo marcado o indirecto, utilizando un segundo anticuerpo marcado contra el anticuerpo primario específico del marcador celular, logrando así la amplificación de la señal. Por otro lado, la presencia o ausencia de la unión al anticuerpo puede ser determinada por diferentes métodos que incluyen pero no se limitan a la radiografía y la microscopia de la inmunofluorescencia. Asimismo, es posible llevar a cabo el monitoreo de los niveles de unión del anticuerpo mediante la citometría de flujo, una técnica que permite que los niveles de fluorocromo estén correlacionados con la cantidad de antígeno presentes en la superficie celular unida específicamente a los anticuerpos etiquetados. La expresión diferencial de una serie de marcadores de superficie en una población celular proporciona un método para la identificación y el aislamiento de dicha población.

En ciertas realizaciones, las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo son suspensiones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo en varias soluciones o materiales, por ejemplo, para uso como fármacos o biomateriales, como es descrito en más detalle a continuación. En una realización, la composición celular comprende una suspensión de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo en la Solución de Ringer y HSA. En otra realización, la composición celular comprende una suspensión de las células madre estromales sujeto derivadas del tejido adiposo en un material, como un polímero, pegamento, gel, etc. Tales suspensiones pueden ser preparadas, por ejemplo, por la sedimentación hacia fuera de las células madre estromales sujeto derivadas del tejido adiposo del medio de cultivo y resuspendiéndolas en el material o solución deseada. Las células pueden ser sedimentadas y/o cambiadas fuera del medio de cultivo, por ejemplo, por la centrifugación, filtración, ultrafiltración, etc.

La concentración del sujeto de composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo puede ser de por lo menos unas 5×10^6 células/mL, por lo menos unas 10×10^6 células/mL, por lo menos unas 20×10^6 células/mL, por lo menos unas 30×10^6 células/mL o por lo menos unas 40×10^6 células/mL.

En consecuencia, otro aspecto de la presente invención pertenece a la progenie del sujeto de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, aquellas células que han sido derivadas de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo. Tal progenie puede incluir las generaciones subsiguientes de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo, así como las células de linaje cometidas generadas mediante la inducción de diferenciación del sujeto de células madre estromales derivadas del tejido adiposo después de su aislamiento del explante, por ejemplo, Inducidas in vitro. En ciertas realizaciones, las células progenie se obtienen después de cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9 o cerca de 10 pases de la población parental. Sin embargo, las células progenie pueden ser obtenidas después de cualquier número de pases de la población paternal.

Las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo de la invención se proporcionarán como parte de una preparación farmacéutica, por ejemplo, una preparación estéril, libre de la presencia de virus no deseados, bacterias y otros agentes patógenos, así como libre de pirogenos. Es decir, para la administración a humanos, las composiciones sujeto deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad así como los estándares generales de seguridad y pureza como se requieren por los estándares de la Oficina de Productos Biológicos de la FDA.

En ciertas realizaciones, tales composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo pueden utilizarse para el trasplante en animales, preferiblemente mamíferos e incluso más preferentemente los seres humanos. La invención utiliza células que son alogénicas con respecto al anfitrión del trasplante. Debido a dificultades en la obtención de suficientes células madre autólogas, las células madre estromales derivadas del tejido

adiposo de un donante alogénico podrían constituir una valiosa fuente alternativa de células madre para el uso terapéutico. Si se conoce en el arte que las células madre estromales de la médula ósea y las células estromales derivadas del tejido adiposo no provocaron una respuesta de los linfocitos alogénicos in vitro y consecuentemente, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo derivadas de un donante, teóricamente, podrían ser utilizadas en cualquier paciente, independientemente de la incompatibilidad del MHC.

Los métodos de administración de las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo en sujetos, particularmente los sujetos humanos, que son descritos en detalle en el presente, incluyen la inyección o implantación de las células en el sitio destinatario en los sujetos, las células pueden introducirse en un dispositivo que facilita la introducción por inyección o implantación de las células en los sujetos. Tales dispositivos de entrega incluyen tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y líquidos en el cuerpo de un recipiente sujeto. En una realización preferida, adicionalmente los tubos tienen una aguja, por ejemplo, una jeringa, por la cual las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo pueden introducirse en el sujeto en una ubicación deseada. Las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo pueden insertarse en un dispositivo entrega, por ejemplo, una jeringa, de diferentes formas. Por ejemplo, las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo incluyen las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo que son suspendidas en una solución o embebidas en una matriz de soporte cuando son contenidas en tal dispositivo de entrega.

Portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de dichos portadores y diluyentes es muy conocido en el arte. La solución es preferentemente estéril y fluida en la medida en que existe una jeringabilidad fácil. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservada contra la acción de contaminación de microorganismos como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Soluciones que son composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo de la invención pueden ser preparadas al incorporar células madre estromales derivadas del tejido adiposo como se describe en el presente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según sea necesario, otros ingredientes enumerados anteriormente, seguidos por la esterilización filtrada.

Algunos ejemplos de materiales y soluciones que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptable incluyen: (1) los azúcares, como la lactosa, glucosa y sacarosa; (2) los almidones, tales como el almidón de maíz y el almidón de patata; (3) la celulosa y sus derivados, como la carboximetilcelulosa sódica, la celulosa de etilo y el acetato de celulosa; (4) la goma tragacanto en polvo; (5) la malta; (6) la gelatina, (7) el talco; (8) excipientes, como la manteca de cacao y supositorios de ceras; (9) aceites, como el aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de safflower, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; (10) glicoles, como el glicol de propileno; (11) polioles, tales como la glicerina, sorbitol, manitol y glicol de polietileno; (12) ésteres, como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tampón, tales como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; (15) el ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhidridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

En ciertas realizaciones, las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo también incluyen un adhesivo. En ciertas realizaciones, el adhesivo es un adhesivo a base de fibrina, como un gel de fibrina o un pegamento de fibrina, o un polímero o un adhesivo basado en fibrina, u otro adhesivo de tejido o pegamento quirúrgico, tales como, por ejemplo, el cianoacrilato, el colágeno, la trombina, y el glicol polietileno. Otros materiales que pueden ser utilizados incluyen, pero no se limitan, el alginato de calcio, la agarosa tipos I, II, IV u otra isoforma de colágeno, el ácido poliláctico/poliglicólico, los derivados de hyaluronate u otros materiales (Perka C. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:305-311; Sechrist VF. et al. (2000) J. Biomed. Mater. Res. 49:534-541; Chu CR et al. (1995) J. Biomed. Mater. Res. 29:1147-1154; Hendrickson DA et al. (1994) Orthop. Res. 12:485-497). En otras realizaciones, el adhesivo es una venda líquida en donde las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo del método son mezcladas con el material del vendaje líquido. Un "vendaje líquido" es una solución que comprende un compuesto, por ejemplo, un material polimérico que se aplica a una herida con un spray o un cepillo, seguido por la eliminación del disolvente por la vaporización para proporcionar una lámina protectora sobre la herida.

También se divulgan en la presente los métodos para preparar composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo que comprenden compuestos o materiales para el uso en la reparación de fístula o heridas. En una realización, un método de preparación de dichos materiales comprende suspender las células madres estromales derivadas del tejido adiposo de una composición celular sujeto con el material. En una realización, las células estromales derivadas del tejido adiposo se sedimentan en el medio de cultivo y se resuspenden en un gel o pegamento de fibrina. Los pegamentos y geles de fibrina y otros polímeros y adhesivos a base de fibrina son muy conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un kit de pegamento de fibrina comercialmente disponible es el Tissucol® Duo 2.0, y otros selladores de fibrina comercialmente disponibles incluyen el Crosseal®, el TISSEEL VH Fibrin Sealant®, y similares.

Las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo de la invención también pueden ser utilizadas para recubrir un soporte, por ejemplo, un dispositivo médico. Por ejemplo, el soporte puede ser una sutura, un hilo, un dispositivo de reparación del menisco, un remache, una tachuela, una grapa, un tornillo, una placa ósea, un sistema de placa ósea, una malla quirúrgica, un parche, por ejemplo, un parche de reparación, un parche cardiovascular, o un parche de pericardio, un cabestrillo, un pin ortopédico, una barrera de adhesión, un uro cultivo, un dispositivo de reparación/regeneración tisular guiada, un dispositivo de reparación del cartílago articular, una guía del nervio, un dispositivo de reparación del tendón, un dispositivo de la reparación del defecto septal atrial, un agente de carga o relleno, una válvula de vena, un andamio de médula ósea, un dispositivo de regeneración del menisco, un injerto para ligamentos y tendones, un implante de células oculares, una jaula de fusión espinal, un sustituto de piel, un sustituto dural, un sustituto de injerto óseo, pasador del hueso, un vendaje para heridas, un pegamento, un polímero o unas pinzas hemostáticas.

Soportes a los cuales las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo pueden ser incorporadas o incrustadas o los cuales pueden ser recubiertos con composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo incluyen matrices que son compatibles con el receptor y que degradan en productos que no son dañinos al receptor. Las matrices biodegradables naturales y/o sintéticas son ejemplos de tales matrices. Las matrices biodegradables naturales incluyen los coágulos de plasma, por ejemplo, derivados de un mamífero y las matrices de colágeno. Las matrices biodegradables sintéticas incluyen los polímeros sintéticos tales como los polianhídridos, los poliortoésteres y el ácido poliláctico. Otros ejemplos de polímeros sintéticos y métodos de incorporación o intususcepción de células en estas matrices son conocidos en el arte. Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,298,002 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,308,701. Estas matrices proporcionan soporte y protección para las frágiles células in vivo.

El soporte puede ser recubierto por células de cualquier manera, como conocido por uno de habilidad en el arte, por ejemplo, por la inmersión, la aspersion, la pintura, la impresión, etc.

En una realización, el soporte es una sutura, una grapa, un hilo absorbible, un hilo no absorbible, un hilo natural, un hilo sintético o un hilo monofilamento o multifilamento (también llamado trenza). Los métodos preferidos en la preparación de suturas y otros soportes utilizados para cerrar las heridas que están recubiertos de células madres estromales derivadas del tejido adiposo son revelados en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/056,241 "Biomaterial for Suturing", registrada el 14 de febrero de 2005. Las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo divulgadas adjunto representan novedosas composiciones que pueden ser utilizadas con los métodos discernidos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/056, 241.

Además, en cualquiera de las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo, por lo menos un agente terapéutico puede incorporarse en la composición. Por ejemplo, una composición puede contener un analgésico, para ayudar en el tratamiento de la inflamación o dolor en el sitio de la fístula o herida, o un agente antiinfeccioso para evitar la infección del sitio tratado con la composición.

Más específicamente, ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos útiles incluyen las siguientes categorías terapéuticas: los analgésicos, como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, los agonistas opiáceos y los salicilatos; los agentes antiinfecciosos, tales como los antihelmínticos, los antianaerobios, los antibióticos, los antibióticos aminoglucósidos, los antibióticos antimicóticos, los antibióticos de cefalosporinas, los antibióticos macrólidos, los antibióticos β -lactámicos misceláneos, los antibióticos de penicilina, los antibióticos de quinolonas, los antibióticos de sulfonamida, antibióticos de tetraciclina, los antimicobacterianos, los antimicobacterianos contra la tuberculosis, los antiprotozoarios, los antiprotosoarios antipalúdicos, los agentes antivirales, los agentes antirretrovirales, las escabicidas, los agentes antiinflamatorios, los agentes antiinflamatorios corticosteroides, los anestésicos locales/antipruriginosos, los tópicos antiinfecciosos, los tópicos antiinfecciosos antimicóticos y los tópicos antiinfecciosos antivirales; los agentes electrolíticos y renales, como los agentes acidificantes, los agentes alcalinizantes, los diuréticos, los diuréticos inhibidores de la anhidrasa carbónica, los diuréticos del asa, los diuréticos osmóticos, los diuréticos ahorradores de potasio, los diuréticos tiazídicos, los reemplazos de electrolitos y los agentes uricosúricos; las enzimas, tales como las enzimas pancreáticas y las enzimas trombolíticas; los agentes gastrointestinales, como los antidiarreicos, los antieméticos, los agentes antiinflamatorios gastrointestinales, los agentes antiinflamatorios gastrointestinales salicilatos, los agentes antiulcerosos antiácidos, los agentes antiulcerosos inhibidores de la bomba de ácido gástrico, los agentes antiulcerosos para la mucosa gástrica, los agentes antiulcerosos bloqueadores de H₂, los agentes colestrolíticos, los digestivos, los eméticos, los laxantes y los ablandadores de heces y los agentes procinéticos; los anestésicos generales, tales como los anestésicos por inhalación, los anestésicos por inhalación halogenados, los anestésicos intravenosos, los anestésicos intravenosos barbitúricos, los anestésicos intravenosos benzodiacepinas y los anestésicos intravenosos agonistas opiáceos; las hormonas y los modificadores de hormona, como los abortivos, los agentes suprarrenales, los agentes suprarrenales corticosteroides, los andrógenos, los contra-andrógenos, los agentes inmunobiológicos, tales como las inmunoglobulinas, los inmunosupresores, los toxoides y las vacunas; los anestésicos locales, tales como los anestésicos locales del tipo amida y los anestésicos locales éster; los agentes músculoesqueléticos, como los agentes antiinflamatorios contra la gota, los agentes antiinflamatorios corticosteroides, los agentes antiinflamatorios compuestos de oro, los inmunosupresores antiinflamatorios, los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), los

agentes antiinflamatorios salicilatos y los minerales; y las vitaminas, como la vitamina A, la vitamina B, la vitamina C, la vitamina D, la vitamina E y la vitamina K.

5 Las clases preferidas de los agentes terapéuticos útiles de las categorías anteriores incluyen: (1) los analgésicos en general, como la lidocaína o sus derivados y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos analgésicos (AINES), incluyendo el diclofenaco, el ibuprofeno, el ketoprofeno y el naproxeno; (2) los analgésicos agonistas opiáceos, como la codeína, el fentanyl, la hidromorfona y la morfina; (3) los analgésicos salicilatos, como la aspirina (ASA) (ASA recubrimiento entérico); (4) los antihistamínicos bloqueadores H1, tales como la clemastina y la terfenadina; (5) los agentes antiinfecciosos, tales como la mupirocina; (6) los antianaerobios antiinfecciosos, tales como el cloranfenicol y la clindamicina; (7) los antibióticos antiinfecciosos antifúngicos, tales como la anfotericina B, el clotrimazol, el fluconazol y el ketoconazol; (8) los antibióticos antiinfecciosos macrólidos, como la azitromicina y la eritromicina; (9) los antibióticos antiinfecciosos β -lactámicos misceláneos, como el aztreonam o el imipenem; (10) los antibióticos antiinfecciosos penicilinas, tales como la nafcilina, la oxacilina, la penicilina G y la penicilina V; (11) los antibióticos antiinfecciosos quinolonas, como la ciprofloxacina y la norfloxacina; (12) los antibióticos antiinfecciosos tetraciclinas, como la doxiciclina, la minociclina y la tetraciclina; (13) los antimicobacterianos antiinfecciosos antituberculosos, como la isoniazida (INH) y la rifampicina; (14) los antiprotozoarios antiinfecciosos, tales como la atovacuona y la dapsona; (15) los antiprotozoarios antiinfecciosos antipalúdicos, como la cloroquina y la pirimetamina; (16) los antirretrovirales antiinfecciosos, como el ritonavir y la zidovudina; (17) los agentes antiinfecciosos antivirales, tales como el interferón alfa, el ganciclovir, el aciclovir y la rimantadina; (18) los tópicos antiinfecciosos antifúngicos, como la anfotericina B, el clotrimazol, el miconazol y la nistatina; (19) los tópicos antiinfecciosos antivirales, tales como el Aciclovir; (20) los agentes electrolíticos y renales, como la lactulosa; (21) los diuréticos, como la furosemida; (22) los diuréticos ahorradores de potasio, como el triamterene; (23) los diuréticos tiazídicos, como la hidroclorotiazida (HCTZ); (24) los agentes uricosúricos, como el probenecid; (25) las enzimas como la RNasa y la DNasa; (26) los antieméticos, tales como la proclorperazina; (27) los agentes antiinflamatorios gastrointestinales salicilatos, como la sulfasalazina; (28) los agentes antiulcerosos inhibidores de la bomba de ácido gástrico, como el omeprazol; (29) los agentes antiulcerosos bloqueadores H2, tales como la cimetidina, la famotidina, la nizatidina, y la ranitidina; (30) los digestivos, como la pancrelipasa; (31) los agentes procinéticos, como la eritromicina; (32) los anestésicos locales éster, como la benzocaína y la procaína; (33) los agentes antiinflamatorios músculoesqueléticos corticosteroides, como la beclometasona, la betametasona, la cortisona, la dexametasona, la hidrocortisona y la prednisona; (34) los inmunosupresores antiinflamatorios músculoesqueléticos, como la azatioprina, la ciclofosfamida y el metotrexato; (35) los fármacos antiinflamatorios no esteroideos músculoesqueléticos (AINES), como el diclofenaco, el ibuprofeno, el ketorolaco, el ketoprofeno y el naproxeno; (36) los minerales como el hierro, el calcio y el magnesio; (37) los compuestos de la vitamina B, tales como la cianocobalamina (vitamina B12) y la niacina (vitamina B3); (38) los compuestos de la vitamina C, tales como el ácido ascórbico; y los compuestos de la vitamina D (39), como el calcitriol.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico puede ser un factor de crecimiento u otra molécula que afecta la diferenciación y/o proliferación celular. Los factores de crecimiento que inducen los estados de diferenciación final son bien conocidos en el arte, y pueden ser seleccionados de cualquier factor que se ha demostrado para inducir un estado de diferenciación final. Los factores de crecimiento pueden ser, en ciertas realizaciones, variantes o fragmentos de un factor de crecimiento que ocurre naturalmente. Por ejemplo, se puede generar una variante al hacer cambios conservadores al aminoácido y probando la variante resultante en uno de los ensayos funcionales descritos u otros análisis funcionales conocidos en el arte. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas son la glicina, la alanina, la valina, la leucina y la isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático son la serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida son la asparagina y la glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas son la fenilalanina, la tirosina y el triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas son la lisina, la arginina y la histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre son la cisteína y la metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservadora de aminoácidos son: la valina-leucina-isoleucina, la fenilalanina-tirosina, la lisina-arginina, la alanina-valina y la asparagina-glutamina.

Como los expertos en la técnica apreciarán, las variantes o fragmentos de los factores de crecimiento de los polipéptidos se pueden generar usando técnicas convencionales, tales como la mutagénesis, incluyendo la creación de mutación(es) genética(s) discreta(s) o por truncamiento. Por ejemplo, la mutación puede dar lugar a variantes que retienen sustancialmente la misma, o simplemente un subconjunto, de la actividad biológica de un factor de crecimiento polipéptido de la que se deriva.

60 3. Métodos de Preparación de Novedosas Composiciones de Células Madre Estromales Derivadas del Tejido Adiposo

También se proporcionan los métodos de preparación de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo que comprenden las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo anteriormente descritas. En una realización, un método comprende: (A) la recogida del tejido adiposo de un sujeto; (B) el obtener

una suspensión de células por la digestión enzimática; (C) la sedimentación de la suspensión celular y la resuspensión de las células en un medio de cultivo; (D) la cultivación de las células durante al menos 10 días; y (g) la expansión de las células durante al menos dos pases del cultivo.

5 Preferiblemente, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo se aíslan del tejido adiposo del sujeto en el cual las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo han de ser introducidas. Sin embargo, las células madre estromales también pueden ser aisladas de cualquier organismo de la misma o diferentes especie que el sujeto. Cualquier organismo con tejido adiposo puede ser un candidato potencial. Preferiblemente, el organismo es mamífero, más preferiblemente el organismo es humano.

10 En ciertas realizaciones, las células se cultivan durante al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 25 días, o al menos aproximadamente 30 días. Es preferible que las células sean expandidas en el cultivo durante más tiempo para mejorar la homogeneidad del fenotipo de las células en la población celular.

15 En ciertas realizaciones, las células se expanden en el cultivo durante al menos tres pases del cultivo o "se pasan al menos tres veces." En otras realizaciones, las células se pasan al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, o al menos diez veces. Es preferible que las células se pasen más de tres veces para mejorar la homogeneidad del fenotipo de las células en la población celular. De hecho, las células se pueden expandir en el cultivo indefinidamente siempre que la homogeneidad del fenotipo celular es mejorada y la capacidad diferencial es mantenida.

20 Las células se pueden cultivar por cualquier técnica conocida en la técnica para el cultivo de células madre. Una discusión de las diversas técnicas de cultivo, así como su ampliación, se puede encontrar en Freshney, R.I., Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition, Wiley-Liss 2000. En ciertas realizaciones, las células son cultivadas mediante el cultivo en monocapa. En una realización, las células son cultivadas y pasadas como se describe en el Ejemplo 1 a continuación.

30 Cualquier medio capaz de soportar las células estromales de un cultivo de tejidos puede ser utilizado. Formulaciones de medios que favorecen el crecimiento de los fibroblastos incluyen, pero no están limitadas al, medio Eagle modificado por Dulbecco (MEMD), el medio mínimo esencial modificación alpha (MEM Alpha) y el medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) y similares. Por lo general, se añadirá 0 a 20% de suero fetal bovino (SFB) o 1 a 20% de suero de caballo a los medios anteriores con el fin de soportar el crecimiento de las células estromales y/o los condrocitos. Sin embargo, un medio definido podría ser utilizado si los factores de crecimiento necesarios, las citoquinas y las hormonas en SFB para las células estromales y los condrocitos pues son identificados y proporcionados a concentraciones apropiadas en el medio de crecimiento. Los medios útiles en los métodos de la invención pueden contener uno o más compuestos de interés, incluyendo, pero no limitado a los antibióticos mitogénicos o los compuestos de diferenciación para las células estromales. Las células serán crecidas a temperaturas entre 31 °C y 37 °C en un incubador humidificado. El contenido de óxido de carbono se mantendrá entre 2% a 10% y el contenido de oxígeno entre 1% y 22%. Las células pueden permanecer en este ambiente durante periodos de hasta 4 semanas.

40 Los antibióticos que pueden ser suplementados en el medio incluyen, pero no se limitan a, la penicilina y la estreptomycinina. La concentración de la penicilina en el medio de cultivo químicamente definido es de alrededor de 10 a alrededor de 200 unidades por ml. La concentración de estreptomycinina en el medio de cultivo químicamente definido es de alrededor de 10 a alrededor de 200 ug/ml.

50 Las células madre estromales derivadas del tejido adiposo pueden ser transfectadas o transducidas de forma estable o transitoria con un ácido nucleico de interés usando una estrategia de vector plasmídico, viral o alternativa. Los ácidos nucleicos de interés incluyen, pero no se limitan a, los productos de codificación de genes que mejoran la producción de componentes de la matriz extracelular que se encuentran en el tipo de tejido a reparar, por ejemplo, la pared intestinal o la pared vaginal.

55 La transducción de vectores virales que llevan genes reguladores en las células madre estromales se puede realizar con los vectores virales (adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociado, u otro vector) purificados por bandas de cloruro de cesio u otro método a una multiplicidad de infección (unidades virales:célula) de entre 10:1 a 2000:1. Las células serán expuestas al virus en un medio libre de suero o un medio con suero en la ausencia o presencia de un detergente catiónico tal como polietilenimina o Lipofectamine™ durante un período de 1 hora a 24 horas (Byk T. et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2493-2502; Sommer B. et al. (1999) Calcif. Tissue Int. 64:45-49).

60 Otros métodos adecuados para transferir vectores o plásmidos en células madre incluyen los complejos ADN-lípido, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,578,475; 5,627,175; 5,705,308; 5,744,335; 5,976,567; 6,020,202; y 6,051,429. Los reactivos adecuados incluyen la lipofectamine, un liposoma de formulación 3:1 (w/w) del lípido policatiónico 2, 3-dioleiloxi-N[2(esperminocarboxamido)etil]-N, N-dimetil-1-propanaminio trifluoroacetato (DOSPA) (Nombre en el Registro de Chemical Abstracts: N-[2-(2,5-bis [(3-aminopropil)

65

amino]-1-oxpentil]amino)etil]-N, N-dimetil-2,3-bis (9-octadeceniloxi)-1-propanaminio trifluoroacetato), y el lípido natural dioleolyphosphatidylethanolamine (DOPE) en agua filtrada por membrana. Ejemplar es la formulación Lipofectamine™ 2000 (disponible de Gibco / Life Technologies # 11668019). Otros reactivos incluyen: el Reactivo de Transfección FuGENE™ 6 (una mezcla de lípidos en forma no liposomal y otros compuestos en 80% de etanol, obtenible de Roche Diagnostics Corp. # 1814443); y el agente reactivo de transfección LipoTAXI™ (una formulación lipídica de Invitrogen Corp., #204110). La transfección de células madre se puede realizar por electroporación, por ejemplo, como se describe en M.L. Roach and J.D. McNeish (2002) *Methods in Mol. Biol.* 185:1. Sistemas de vectores virales adecuados para la producción de células madre con alteraciones genéticas estables pueden ser basados en adenovirus y en retrovirus, y se pueden preparar utilizando componentes de virus disponibles comercialmente.

La transfección de vectores plásmidicos que portan genes reguladores en las células madres estromales pueden ser introducidas en las células en cultivos en monocapa por el uso de precipitado de fosfato de calcio ADN o métodos de detergentes catiónicos (Lipofectamine™, DOTAP) o en cultivos tridimensionales por la incorporación de los vectores de ADN plásmidos directamente en el polímero biocompatible (Bonadio J. et al. (1999) *Nat. Med.* 5:753-759).

Para el seguimiento y la detección de proteínas funcionales codificadas por estos genes, los vectores de ADN virales o plásmidos contendrán un gen marcador fácilmente detectable, tal como la proteína fluorescente verde de la enzima beta-galactosidasa o la enzima beta-galactosidasa, ambas de las cuales pueden ser rastreadas por medios histoquímicos.

4. Métodos de Tratamiento de Fístulas y Heridas

La invención refiere a un novel método para el uso de células madre estromales derivadas del tejido adiposo en el tratamiento de las fístulas y las heridas. En realizaciones preferidas, las células madres estromales son derivadas del tejido adiposo del sujeto a ser tratado. En otras realizaciones preferidas, las células madres estromales derivadas del tejido adiposo contienen una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo descritas en el presente. Sin embargo, otras preparaciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo se pueden utilizar en los métodos descritos aquí, por ejemplo, tales como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,777,231 y 6,555,374 y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/ 065,461 "Identification and Isolation of Multipotent Cells From Non-Osteochondral Mesenchymal Tissue", registrada el 25 de febrero de 2005.

En una realización, un método de tratamiento de una fístula en un sujeto comprende de: (a) cerrar el orificio interno con una sutura y (b) la entrega de por lo menos unas 10×10^6 , por lo menos unas 20×10^6 , por lo menos unas 30×10^6 , o por lo menos unas 40×10^6 de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, en una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo de la invención, al orificio interno cerrado por sutura. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en las cuales la primera entrega de las células es insuficiente, el método puede abarcar aún más: (c) el entregar una segunda dosis de al menos unos 20×10^6 , por lo menos unos 30×10^6 o por lo menos unos 40×10^6 de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, en una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo de la invención, al orificio interno cerrado por sutura.

En otra realización, una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo utilizada en el método es una en la cual por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o preferiblemente un 96%, 97%, 98% o 99% de las células madre expresan los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y/o CD105.

En otra realización, la composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo utilizada en el método es una en la cual por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95% o preferiblemente al menos un 96%, 97%, 98% o 99% de las células madres expresan los marcadores c-Kit, vimentina y CD90.

Métodos comunes de administración de las células de la presente invención en los sujetos, particularmente los sujetos humanos, algunos de los cuales se describen en detalle en el presente, incluyen la inyección o implantación de las células en el sitio destinatario en los sujetos, las células de la invención pueden introducirse en un dispositivo de entrega que facilita la introducción, por inyección o implantación, de las células en los sujetos. Tales dispositivos de entrega incluyen los tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar las células y fluidos en el cuerpo de un sujeto destinatario. En una realización preferida, adicionalmente los tubos tienen una aguja, por ejemplo, una jeringa, por la cual las células de la invención pueden introducirse en el sujeto en una ubicación deseada. Las células de la invención pueden ser insertadas en un dispositivo de entrega, por ejemplo, una jeringa, en diferentes formas. Por ejemplo, las células pueden ser suspendidas en una disolución o embebidas en una matriz de soporte cuando son contenidas en tal dispositivo de entrega. Portadores y diluyentes farmacéuticamente

aceptables incluyen la solución salina, las soluciones tampón acuosas, los disolventes y/o los medios de dispersión. El uso de dichos portadores y diluyentes es muy conocido en el arte. La solución es preferentemente estéril y fluida en la medida de que exista una jeringabilidad fácil. Preferentemente, la solución es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservada contra la acción contaminante de los microorganismos tales como las bacterias y los hongos mediante el uso de, por ejemplo, los parabenos, el clorobutanol, el fenol, el ácido ascórbico, el timerosal y similares. Soluciones de la invención pueden ser preparadas mediante la incorporación de células progenitoras, como se describen en el presente, en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, según sea necesario, otros ingredientes enumerados anteriormente seguidos de la esterilización filtrada.

En otras realizaciones, un método de tratamiento de una fístula en un sujeto comprende de: (a) cerrar el orificio interno con una sutura que se compone de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, de una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo del sujeto. Tales suturas recubiertas con células en las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo del sujeto son descritas detalladamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/056,241, registrada el 14 de febrero de 2005.

Los métodos en algunas realizaciones pueden comprender aún más: (d) el raspado profundo de por lo menos un conducto de la fístula y el relleno (e) de dicho conducto de la fístula con un material. En ciertas realizaciones, el método puede comprender aún más como la entrega de al menos unas 10×10^6 de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, de la composición celular del sujeto, al material. Preferentemente, el material es un polímero o adhesivo a base de fibrina, como un gel o pegamento de fibrina. En ciertas encarnaciones, la dosis de al menos unas 10×10^6 de células madre estromales derivadas del tejido adiposo ya está encompasada dentro del material, por ejemplo, tal que el material se compone de la composición de células madre derivadas del tejido adiposo.

En una realización adicional, un método de tratamiento de una fístula en un sujeto comprende:

- (i) el raspado profundo de al menos un conducto de fístula;
- (ii) el cierre del orificio interno del conducto raspado por sutura;
- (iii) la entrega de al menos unas 10×10^6 , al menos unas 20×10^6 , al menos unas 30×10^6 o al menos unas 40×10^6 de células madre estromales derivadas de tejido adiposo al orificio interno cerrado por sutura;

por ejemplo, en una composición de células madre derivadas del tejido adiposo de la invención.

En ciertas realizaciones, por ejemplo, en las cuales la primera entrega de las células es insuficiente, el método puede abarcar aún más:

- (iv) la entrega de una segunda dosis de al menos unas 20×10^6 , al menos unas 30×10^6 o al menos unas 40×10^6 de células madre derivadas del tejido adiposo al orificio interno cerrado por sutura,

por ejemplo, en una composición de células madre derivadas del tejido adiposo de la invención.

El paso (i) es preferentemente realizado por el raspado profundo de todos los conductos de la fístula a ser tratados, por ejemplo, una aguja de legrado es introducida en el trayecto de la fístula, y una hemorragia inducida es producida por el raspado de las paredes de la fístula para obtener la fibrina natural que llenará el trayecto de la fístula. Los ensayos clínicos recientes realizados por los inventores, sugieren que la fibrina natural producida por este método de raspado es una opción preferida en comparación con el uso de los sellos de fibrina artificiales, por lo tanto en una realización preferida del método de la invención, los trayectos fistulosos a ser tratados no se llenan con dicho material.

El paso (iv) es preferentemente realizado por la entrega local de las células, por ejemplo una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por inyección en las paredes de la fístula a lo largo del trayecto de la fístula. Por ejemplo, dos inyecciones de 10 millones de células a lo largo de 3 cm. de trayecto de la fístula.

Los métodos divulgados en la presente pueden ser utilizados para el tratamiento de cualquier fístula, incluyen pero no son limitados a, la fístula anorrectal o la fístula anal o la fístula fecal, la fístula arteriovenosa o la fístula de AV, la fístula biliar, la fístula cervical, la fístula craneosinusal, la fístula enteroentérica, la fístula enterocutánea, la fístula enterovaginal, la fístula gástrica, la fístula perilinfática, la fístula metroperitoneal, la fístula arteriovenosa pulmonar, la fístula rectovaginal, la fístula umbilical, la fístula traqueoesofágica y la fístula vésicovaginal. Preferentemente, los métodos pueden utilizarse para el tratamiento de las fístulas intestinales, por ejemplo, ésas que conectan el intestino a sí mismo o a otro órgano, como la fístula rectovaginal, la fístula enteroentérica, la fístula enterocutánea y la fístula enterovaginal. En otras realizaciones preferidas, los métodos pueden usarse para tratar las fístulas vaginales o uterinas, por ejemplo, ésas conectando la vagina o el útero a sí mismo o a otro órgano, como la fístula cervical, la fístula rectovaginal, la fístula enterovaginal y la fístula

vésicovaginal.

La fístula puede ser accesada para la reparación quirúrgica mediante cualquier método conocido en el arte, por ejemplo, mediante una incisión, un catéter, etc.

5
10
15
20

En otra realización, un método para tratar una herida en un sujeto comprende de: (a) cerrar la herida por sutura y (b) la entrega de por lo menos unas 10×10^6 , por lo menos unas 20×10^6 , por lo menos unas 30×10^6 o por lo menos unas 40×10^6 de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, en una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo, a la herida cerrada por sutura. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en las cuales la primera entrega de las células es insuficiente, el método puede abarcar aún más: (c) la entrega de una segunda dosis de al menos unas 20×10^6 , a lo menos unas 30×10^6 o al menos unas 40×10^6 de células madres estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, en una composición de células madre derivadas del tejido adiposo, a la herida cerrada por sutura. En otras realizaciones, la herida puede llenarse con una composición de células madres estromales derivadas del tejido adiposo de la invención, por ejemplo, una dosis de al menos unas 10×10^6 de células madres estromales derivadas del tejido adiposo englobadas dentro de un material, por ejemplo, tal que el material compone la composición celular, en donde el material es, por ejemplo, un adhesivo o un pegamento. En otras realizaciones, un método de tratamiento de una herida en un sujeto comprende de: (a) cerrar la herida con una sutura que se compone de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo, por ejemplo, de la composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo de un sujeto. Tales suturas revestidas con células procedentes de las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo del sujeto fueron descritas en detalle anteriormente y en la Solicitud de Patentes de los Estados Unidos No. 11/056,241, registrada el 14 de febrero de 2005.

25
30
35

Los métodos descritos anteriormente pueden abarcar además el administrar un agente terapéutico en el sujeto siendo tratado, por ejemplo, sistémicamente o localmente en el sitio de la sutura. En ciertas realizaciones, las células madre estromales derivadas del tejido adiposo son formuladas en una composición de células madre estromales derivadas del tejido adiposo que contienen un agente terapéutico, como descritas anteriormente. En otras realizaciones, el agente terapéutico es administrado por separado, por ejemplo, simultáneamente con los métodos, antes de realizar el método, o después de realizar el método. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es administrado en el sujeto antes, durante y después de que los métodos son llevados a cabo en el sujeto. Los agentes terapéuticos ejemplares fueron descritos anteriormente. En realizaciones preferidas, los agentes terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn son administrados en el sujeto. Los agentes terapéuticos ejemplares de la enfermedad de Crohn son los agentes antiinflamatorios como los agentes que comprenden la mesalamina, los agentes inmunosupresores como la 6-mercaptopurina y la azatioprina; los agentes biológicos como el Infliximab (Remicade®), los antibióticos y los agentes antidiarreicos como el difenoxilato y la loperamida y la codeína.

40

En realizaciones en donde se utilizan células madre alogénicas, el tratamiento de soporte puede ser requerido. Por ejemplo, los inmunosupresores pueden administrarse antes, durante y/o después del tratamiento para prevenir la GVHD, según métodos conocidos en el arte. Antes de su administración, las células también pueden ser modificadas para suprimir la reacción inmune del sujeto a las células o viceversa, según métodos conocidos en el arte.

45
50

La dosis de cualquier agente terapéutico variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y severidad de la enfermedad a ser tratada o prevenida, la vía de la administración y la forma del agente. Cualquiera de las formulaciones del sujeto pueden ser administradas en una sola dosis o en dosis divididas. Las dosificaciones para los agentes terapéuticos pueden determinarse fácilmente mediante técnicas conocidas a los de habilidad en el arte o como autodidacta en el presente documento. Además, las mezclas de más de un agente terapéutico pueden ser administradas, o múltiples agentes terapéuticos pueden ser administrados en diferentes composiciones.

55

Los agentes terapéuticos pueden ser administrados por vía oral, vía parenteral, por aerosol de inhalación, por vía tópica, por vía rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un reservorio implantado. El término parenteral en el presente documento incluye las técnicas de la inyección o la infusión subcutánea, intracutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

60
65

El tiempo exacto de la administración y la cantidad de cualquier agente en particular que producirá el tratamiento más eficaz en un paciente determinado dependerá de la actividad, la farmacocinética y la biodisponibilidad de un compuesto particular, la condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo de la enfermedad y fase, condición física general, capacidad de respuesta a una determinada dosis y el tipo de medicación), la vía de administración y similares. Las pautas presentadas en el presente pueden usarse para optimizar el tratamiento, por ejemplo, la determinación del momento óptimo o la cantidad de administración, que no requerirá más experimentación sistemática consiste en la supervisión del sujeto y el ajuste de la dosificación y/o la sincronización.

Mientras que el sujeto está siendo tratado, la salud del paciente puede ser controlada mediante la medición de uno o más de los índices relevantes a tiempos predeterminados durante un período de 24 horas. El tratamiento, incluyendo el suplemento, las cantidades, los tiempos de administración y la formulación, puede ser optimizado según los resultados de tal vigilancia. El paciente puede ser reevaluado periódicamente para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros, la primera tal reevaluación que ocurre normalmente al final de cuatro semanas desde el inicio de la terapia y las reevaluaciones posteriores que ocurren cada cuatro a ocho semanas durante la terapia y luego cada tres meses posteriormente. La terapia puede continuar por varios meses o incluso años, con un mínimo de un mes siendo la duración típica de la terapia para los seres humanos. Los ajustes a la cuantía del agente administrado y posiblemente la hora de la administración pueden ser basados en estas reevaluaciones.

El tratamiento puede iniciarse con dosificaciones más pequeñas que son menos que la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, la dosis puede incrementarse en pequeños incrementos hasta que el efecto terapéutico óptimo es alcanzado.

El uso combinado de varios agentes terapéuticos puede reducir la dosificación necesaria para cualquier componente individual porque el inicio y la duración del efecto de los diferentes componentes pueden ser complementarios. En tal terapia combinada, los diferentes agentes activos pueden ser entregados juntos o por separado y simultáneamente o a diferentes momentos dentro del día.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos sujeto pueden ser determinadas mediante los procedimientos farmacológicos estándar en los cultivos celulares o en animales de experimentación, para la determinación de la LD50 y ED50. Las composiciones que exhiben grandes índices terapéuticos son preferibles. Aunque compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos pueden ser utilizados, debe tenerse cuidado al diseñar un sistema de entrega dirigido a los agentes al lugar deseado en orden de reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos del cultivo celular y los ensayos en animales pueden utilizarse en la formulación de un rango de dosificaciones para uso en los seres humanos. La dosificación de cualquier agente terapéutico, o alternativamente de cualquiera de los componentes, se encuentra preferentemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen el ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para los agentes de la invención presente, la dosis terapéutica efectiva puede estimarse inicialmente de los ensayos del cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos de animales para lograr un rango de concentración plasmática circulante que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto prueba que alcanza una inhibición máxima media de los síntomas) según lo determinado en el cultivo celular. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante la cromatografía líquida de alto rendimiento.

5. Kits

En otras realizaciones, la invención considera los kits incluyendo las composiciones de células madre estromales derivadas del tejido adiposo y, opcionalmente, las instrucciones para su uso. Los kits que comprenden las composiciones farmacéuticas y biomateriales de la invención presente también están dentro del alcance de la invención. Los componentes del kit pueden ser empacados para la práctica manual o, parcialmente o totalmente automatizada de los métodos anteriores. Tales kits pueden tener una variedad de usos incluyendo, por ejemplo, la terapia, la reparación, la preparación de biomateriales y otras aplicaciones.

Ejemplificación

La invención ahora generalmente descrita, será más fácilmente entendida en referencia a los ejemplos siguientes, que son incluidos únicamente con el propósito de la ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la invención presente y no están destinados a limitar a la invención.

Ejemplo 1.- Preparación de Células Madre de Lipoaspirados Con Homogeneidad Mejorada

El tejido adiposo fue obtenido por liposucción, bajo anestesia local y la sedación general. Una cánula de punta hueca se introdujo en el espacio subcutáneo a través de una incisión pequeña (menos de 0.5 cm de diámetro). Con una succión suave, la cánula se trasladó a través del compartimiento del tejido adiposo de la pared abdominal para la interrupción mecánica del tejido graso. Una solución salina y una epinefrina vasoconstrictor fueron inyectadas en el compartimiento del tejido adiposo para minimizar la pérdida de sangre. De esta manera, se obtuvieron de 80 a 100 ml de lipoaspirado crudo de cada paciente a ser tratado.

El lipoaspirado crudo fue extensivamente lavado con una solución salina estéril de tampón fosfato (PBS; Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK) para eliminar a las células sanguíneas, el anestésico local y la salina. La matriz extracelular fue digerida con una solución de colagenasa tipo II (0.075%; Gibco BRL) en una solución salina

equilibrada (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA) durante 30 min. a 37 ° C para liberar a la fracción celular. Entonces la colagenasa fue inactivada por la adición de un volumen igual de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco BRL) que contenía 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco BRL). La suspensión de células fue centrifugada a 250 x g por 10 min. Las células fueron resuspendidas en 0.16 M NH₄Cl y fueron reposadas durante 10 min. a temperatura ambiente (RT en inglés) para la lisis de los eritrocitos. La mezcla fue centrifugada a 250 x g, y las células fueron resuspendidas en DMEM más 10% de SFB y 1% de una mezcla de ampicilina/estreptomicina (Gibco, BRL) y luego fueron plaqueadas en placas de cultivo tisular de 100 mm en una concentración de 10-30 x 10³ células/cm².

Las células fueron cultivadas durante 24 h a 37 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂ en el aire. Entonces las placas se lavaron con PBS para eliminar las células no adherentes y los fragmentos celulares. Las células fueron mantenidas en el cultivo en el mismo medio y bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%, con el reemplazo del medio del cultivo cada 3 a 4 días. Las células luego fueron pasadas con tripsina-EDTA (Gibco BRL) en una dilución de 1:3 que corresponde a una densidad de célula de aproximadamente 5-6 x 10³ células/cm². Para la trasplatación, hemos utilizado células entre 1 y 3 pases, con células pasadas más de dos veces siendo preferible para aislar una población celular con alta homogeneidad. La caracterización de la célula fue realizada usando células en pases 1 a 9.

Ejemplo 2.- Caracterización de las Células Madre de Lipoaspirados Con Homogeneidad Mejorada

Para caracterizar las células por tinción de inmunofluorescencia, las células fueron plaqueadas a baja densidad en DMEM más 10% de SFB en cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Para los ensayos de inmunohistoquímica, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en acetona durante 10 min. a -20 ° C. Para la tinción de la a-actina, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Tras bloquear con una PBS que contenía 4% de suero de cabra y 0.1% de Tritón X-100, las células fueron incubadas a 4 ° C durante la noche con anticuerpos primarios contra los siguientes marcadores celulares en las diluciones indicadas [(i) alfa-actina; Dako, Glostrup, Denmark; 1/50; (ii) vimentina; Sigma, St. Louis, USA; 1/200; (iii) CD 90; CYMBUS, Biotechnology LTD, Chandlers Ford, Hants, UK; 1/50; (iv) Factor VIII; Dako; 1/100; (v) CD 34; Chemicon, CA, USA; 1/100; (vi) c-Kit; Chemicon; 1/100; (vii) desmina; Dako; 1/100; (viii) citoqueratina; Dako; 1/100 y (ix) S-100; Dako; 1/50]. A continuación, las células fueron incubadas con los segundos anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado o tetramethylrhodamine isotiocianato cloruro (TRITC)-conjugado (Sigma; 1/50) por 45 min a temperatura ambiental. Para controles negativos se omiten los anticuerpos primarios. Los núcleos fueron contrastados con una tinción de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células luego fueron montadas en Mobiglow (MoBiTec, Göttingen, Germany) y observadas con un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Japan). En cada caso, se determina el número de células inmunopositivas en diferentes campos y se comparan a los números de núcleos teñidos. Campos seleccionados al azar fueron exportados a un ordenador (MacIntosh G3; Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) a través de una cámara SpotIt (Diagnostic Instruments Inc., Tampa, FL, USA). Las células del músculo liso aórtico humano, células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) y fibroblastos sinoviales humanos fueron utilizados como controles positivos para la inmunotinción con anticuerpos distintos.

En el pase 1, un alto porcentaje (90-95%) de las células madres estromales derivadas del tejido adiposo expresaron vimentina, un marcador del citoesqueleto de las células madres mesenquimales (FIGURA 1). La expresión de vimentina se mantuvo al mismo nivel hasta el e incluyendo el pase 9. Los niveles de otros marcadores, sin embargo, bajaron con el tiempo. Por ejemplo, la a-actina, que fue encontrada en el 17% de las células derivadas de LPA en el pase 1 ya no fueron detectables en el paso 7. El marcador de las células endoteliales, el factor de von Willebrand (Factor VIII) y CD34, que también se encuentra en la superficie de las células endoteliales, sólo fue detectado en los pases 1 a 3 (7% y 12% de células inmunopositivas, respectivamente). Por el contrario, la expresión del c-Kit (CD117), un marcador de proliferación celular, fue aumentado con el tiempo, con el 99% de las células inmunopositivas desde el pase 4 en adelante (FIGURA 2). El marcador de fibroblasto CD90, expresado inicialmente en aproximadamente el 80% de las células derivadas de LPA, fue encontrado en el 99% de las células desde el pase 6 (FIGURA 3). Ninguna expresión del marcador neuroectodermal S100 o el marcador ectodérmico queratina fue observada en algún momento en cualquiera de las células derivadas de LPA. El cambio en los marcadores observados mientras el número de pases aumenta indica un aumento en la homogeneidad de la preparación de la célula obtenida.

Para cuantificar el crecimiento celular, las células fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos en una concentración de 5 x 10³ células/cm². Después de que las células se habían unido al sustrato (3 h), el medio del cultivo fue reemplazado por DMEM suplementado con 1% de antibióticos más 0.5%, 2%, 5% o 10% de SFB. Como controles positivos para las pruebas de cada lote de suero, los fibroblastos sinoviales humanos también fueron cultivados y sus tasas de crecimiento fueron determinadas. El medio fue reemplazado cada dos días. A intervalos de 24 h, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1% y el número de células por pocillo fue determinado, después de la tinción nuclear con cristal violeta, mediante el control de la absorbancia a 595 nm. Se construyó una curva estándar para establecer la relación entre el número de células por pocillo y la absorbancia a 595 nm (r²=0.99).

Las células estromales derivadas del tejido adiposo viables fueron aisladas con éxito y cultivadas de todos los siete lipoaspirados (LPA). Estas células fueron crecidas en cultivos y pasadas en intervalos de 7 a 10 días. En algunos casos, las células fueron criopreservadas y descongeladas antes de la implantación. La tasa de crecimiento de las células madres estromales derivadas del tejido adiposo (ADSC) fue dependiente a la concentración de suero, con una proliferación máxima de entre 5% y 10% de SFB (FIGURA 4). El tiempo de la duplicación de la población media en estas concentraciones de suero fue de 37.660.6 h, la cual no difirió significativamente del tiempo de la duplicación de la población de los fibroblastos sinoviales humanos cultivados bajo las mismas condiciones (35.661.4 h; $p > 0.05$; t-test; los resultados de tres experimentos independientes).

Con el fin de analizar las células en una manera más estandarizada y menos subjetiva, las células también fueron sometidas al análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En general, el análisis de citometría de flujo permite la detección de los antígenos de la superficie por los anticuerpos, que son directamente (covalente) o indirectamente (anticuerpo secundario etiquetado fluorescente) vinculados a un marcador fluorescente. Por otro lado, el análisis inmunohistoquímico previamente descrito exigió la permeabilización de las células y la posterior tinción con anticuerpos. Por lo tanto, éste último requiere un protocolo optimizado individualmente dependiendo de la proteína diana y los anticuerpos. Por otra parte, debido a la permeabilización de la membrana celular, no es posible distinguir entre los marcadores de proteínas internas (no enlazadas a la membrana) y las extracelulares. Es decir, con un análisis inmunohistoquímico es posible saber si un marcador de la proteína está siendo expresado pero no es posible distinguir si está siendo expresado en la superficie de la célula o intracelularmente.

El protocolo utilizado en la inmunocitometría para la detección de antígenos de superficie está estandarizado y sólo requiere controles negativos adecuados. Además, el análisis FACS permite una evaluación del porcentaje de las células positivas (las células que expresan el antígeno de la superficie) y el nivel de expresión (muchos o pocos antígenos de superficie en una célula). Estas evaluaciones solamente son de una naturaleza subjetiva utilizando la inmunohistoquímica, y pueden variar de experimento a experimento, lo que no ocurre con el análisis FACS.

Tal caracterización inmunofenotípica de las células puede ser realizada en las células recién aisladas y después de los períodos de cultivo, por ejemplo, en el día 7, después de 4 semanas y después de 3 meses de cultivo. El análisis de los marcadores de superficie en momentos diferentes permite la evaluación de la homogeneidad del fenotipo durante el cultivo. Ejemplos de este análisis y los datos que demuestran el fenotipo obtenido de muestras obtenidas de 3 donantes sanos de cero a tres meses de cultivación son descritos largamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/065,461, registrada el 25 de febrero de 2005.

Después del aislamiento por el método previamente descrito, las células madres estromales derivadas del tejido adiposo de uno de los pacientes fueron caracterizadas en función de la presencia/ausencia de una serie de marcadores de la superficie. Para hacerlo, la expresión de los siguientes marcadores de superficie fue monitoreada mediante la citometría de flujo:

Integrin: CD11b, CD18, CD29, CD49a, CD49b, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD61, CD104.

Marcadores hematopoyéticos: CD3, CD9, CD10, CD13, CD16, CD14, CD19, CD28, CD34, CD38, CD45, CD90, CD133, glicoforina.

Receptores del factor de crecimiento: CD105, NGFR.

Receptores de la matriz extracelular: CD 15, CD31, CD44, CD50, CD54, CD62E, CD62L, CD62P, CD 102, CD 106, CD146, CD 166.

Otros: CD36, CD55, CD56, CD58, CD59, CD95, HLA-I, HLA-II, β 2-microglobulina.

Las células a ser caracterizadas fueron recolectadas mediante la digestión suave con tripsina, lavadas con PBS e incubadas durante 30 minutos a 4 °C con los marcadores de anticuerpos etiquetados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) contra cada uno de los marcadores de superficie a ser analizados. Los marcadores celulares fueron lavados e inmediatamente analizados utilizando el citómetro Epics-XL (Coulter). Como controles, las células manchadas con anticuerpos inespecíficos de los isótopos correspondientes etiquetados con FITC o PE fueron utilizadas.

Del análisis del perfil de expresión de marcadores de superficie (Figura 7A/7B), los criterios utilizados para determinar cuáles marcadores definen la población celular y le permiten ser identificada y distinguida con respecto a otros tipos de célula fueron los siguientes:

1. Desechar los marcadores que varían de una muestra a otra o en el tiempo durante la cultivación en la experimentación hecha con las células madres estromales derivadas del tejido adiposo sanas de donantes

en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/065,461, registrada el 25 de febrero de 2005.

2. Seleccionar los marcadores en función de su relevancia biológica, desechando los marcadores característicos de específicos tipos de células (por ejemplo, el CD3 es un marcador exclusivo de los linfocitos).

Aplicando estos criterios, la población de células madre multipotentes es caracterizada como siendo positiva para CD9+, CD10+, CD13+, CD29+, CD44+, CD49A+, CD51+, CD54+, CD55+, CD58+, CD59+, CD90+ y CD105+; y falta de expresión de CD11b, CD14, CD 15, CD 16, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y CD 133.

Ejemplo 3.- Preparaciones de Células Madres Conteniendo Pegamento de Fibrina Para Uso en el Tratamiento de la Fístula

Para el uso clínico, las células como preparadas anteriormente pueden ser utilizadas después de tres o menos pases (FIGURA 3), pero preferiblemente pueden ser utilizadas después de dos o más pases como descrito anteriormente para conseguir una preparación de células con una mayor homogeneidad. Los cultivos celulares para uso clínico fueron tripsinizados durante 3 minutos a 37 °C. La tripsinización fue parada por la adición de DMEM más SFB, y la suspensión fue centrifugada a 110 x g por 5 min. Las células fueron lavadas en PBS y la suspensión fue centrifugada nuevamente a 150 x g por 5 min. La célula fue resuspendida entre 3 y 30x10⁶ células/ml en 1 a 2 ml de solución Ringer Lactato y fue colocada en una jeringa adecuada. La albúmina sérica humana (HSA) puede añadirse opcionalmente a la solución Ringer lactato.

En algunos casos, la mitad de las células fueron resuspendidas en el componente de trombina de un kit de pegamento de fibrina (Tissucol® Duo 2.0; Baxter, Madrid, Spain) antes de la combinación de los dos componentes del kit, en un intento de mejorar la obturación de los trayectos de las fístulas. El uso del pegamento de fibrina para llenar la apertura de una fístula es conocido en el arte; no obstante, este no es eficaz como un tratamiento independiente para la fístula. La adición del pegamento de fibrina a las composiciones de células madres estromales derivadas del tejido adiposo descritas en el presente sirve para retener las células localmente, y hemos observado que las células crecen bien dentro de los pegamentos y las geles de fibrina.

Ejemplo 4.- Mejora del Procedimiento Quirúrgico Para la Reparación de Fístula Utilizando Preparaciones de Células Madre de Lipoaspirados

Un ensayo clínico en fase I, diseñado para probar la viabilidad y la seguridad del trasplante autólogo de las células madre utilizando las composiciones de células estromales derivadas del tejido adiposo antes descritas para el tratamiento de las fístulas de Crohn, fue conducido. El protocolo fue aprobado por el Clinical Trial and Ethics Committee of La Paz Hospital el 12 de abril de 2002, y un formulario de consentimiento informado detallado fue generado a ser firmado por los pacientes. El Comité de ética fue informado sobre el progreso del ensayo a lo largo del ensayo clínico.

Métodos

Los pacientes fueron seleccionados según los criterios de inclusión siguientes: más de 18 años de edad; diagnóstico de la enfermedad de Crohn por lo menos cinco años antes del ensayo; presencia de una o varias fístulas complejas de Crohn (una fístula enterocutánea, una fístula supraesfinteriana y/o una fístula rectovaginal) que no habían respondido al tratamiento médico y tratadas sin éxito por la cirugía clásica por lo menos dos veces; y el acuerdo de participación, con la firma del formulario de consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: Incumplimiento de los criterios de inclusión; la desventaja mental; la delgadez extrema; la alergia a anestésicos locales; el diagnóstico previo de cáncer; y el SIDA.

Cinco pacientes (números 001-005) fueron inscritos en el ensayo. Hubo tres hombres y dos mujeres, y la edad promedio fue de 35.1 +/- 2.4 años (rango: 31.2 a 37.5 años). Nueve implantes de células fueron realizados: tres en fístulas rectovaginales; cinco en fístulas enterocutáneas; cuatro en diferentes fístulas en un paciente; y uno en una fístula perianal supraesfinteriana. Todas las fístulas enterocutáneas tenían flujo bajo - menos de 50 cc por día - y estaban situadas en la pared abdominal (Tabla 1). Ningún paciente fue tratado con Total Parenteral Nutrition, Remicaid u Octreotide simultáneamente en este procedimiento. Los pacientes 001 y 002 requirieron dos procedimientos de liposucción porque, después de la primera liposucción, las células madre no sobrevivieron la criopreservación.

Un paciente fue excluido debido a la contaminación bacteriana de las células cultivadas. Nueve fístulas fueron inoculadas en cuatro pacientes con células madre estromales autólogas derivadas del tejido adiposo (ADSC) en el pase 3 o anteriormente. Ocho fístulas inoculadas fueron seguidas semanalmente durante por lo menos ocho semanas. En seis de las fístulas, la apertura externa fue cubierta con epitelios al fin de la semana 8 y, por lo tanto, estas fístulas fueron consideradas curadas (75%). En las otras dos fístulas, sólo hubo un cierre incompleto de la

apertura externa, con una disminución en el flujo de salida (no curado; 25%). Ningunos efectos adversos fueron observados en cualquier paciente al final del período de seguimiento (por lo menos seis meses y no más de dos años).

5 En el caso de las fístulas enterocutáneas, todos los conductos fueron raspados profundamente. En el caso de las fístulas rectovaginales, utilizamos un acercamiento vaginal, con el desprendimiento de la pared vaginal posterior. La brecha fue completamente separada y la abertura rectal fue cerrada con puntos de sutura absorbibles 3/0. La mucosa rectal había sido dañada por la enfermedad de Crohn y era extremadamente frágil. En el caso de las fístulas perianales, el trayecto principal fue ahuecado y la abertura rectal fue cerrada con puntos de sutura absorbibles 3/0 a través de la mucosa esclerótica.

10 Utilizando una aguja, en los casos de la fístula enterocutánea, la células fueron inyectadas en la pared del trayecto. En los casos de la fístulas rectovaginales y las perianales, las células fueron inyectadas en la mucosa rectal, cerca de la abertura interna suturada. En todos los casos, una ampolla llena de líquido fue observada en el área de la inyección después de la inyección (FIGURA 5). El número de las células inyectadas osciló entre 3 y 30 x10⁶, dependiendo del crecimiento de las células cultivadas (FIGURE 3).

15 El tiempo desde el comienzo de la preparación del inóculo al final de la inyección fue menos de 90 minutos en todos los casos. En el caso de las fístulas enterocutáneas, los conductos fueron llenados de fibrina y luego la piel fue suturada. En el caso de las fístulas rectovaginales, un colgajo de avance vaginal fue construido. Cuando conductos accesorios fueron detectados, estos también fueron llenados de fibrina.

20 Ninguna venda fue aplicada postoperatoriamente. La ingestión de líquidos fue iniciada doce horas después del procedimiento y la de alimentos sólidos seis horas después. Uno a tres días después de la cirugía, el paciente fue despedido y visitas de seguimiento en la clínica ambulatoria fueron programadas.

25 Dos muestras histopatológicas fueron obtenidas. Una muestra (paciente número 002) fue obtenida de la zona de una fístula enterocutánea (7 meses después del implante #2 y 10 días después del implante #3). El otro espécimen (paciente número 001) fue obtenido de la pared rectovaginal, un año después el primer implante, (implante #1), durante el procedimiento quirúrgico asociado con el implante #6. Los especímenes fueron embebidos en parafina, seccionados, manchados con hematoxilina y eosina y evaluados.

30 El seguimiento semanal fue programado para ocho semanas después de la cirugía. Los pacientes fueron considerados curados cuando una epitelización total de la apertura externa fue evidente después de ocho semanas, independientemente de observaciones previas. Después de ocho semanas, hubo un seguimiento mensual de por lo menos seis meses y no más de dos años.

Resultados

40 Cinco pacientes fueron incluidos en el ensayo y siete liposucciones fueron realizadas (FIGURA 3). El paciente número 003 fue eliminado del ensayo durante el procedimiento de implantación como resultado del descubrimiento de contaminación por bacterias gram-positivas de las células lipoaspiradas cultivadas. La bacteria fue identificada como *Oerkovia xanthineolytica*. Una fístula enterocutánea en el paciente 002 fue eliminada del ensayo debido a una cirugía abdominal de emergencia para una nueva fístula enterovesical que había resultado en sepsis aguda. La laparotomía requirió la resección de la zona del implante. Por lo tanto, no pudimos adherir al seguimiento mínimo de ocho semanas programado en este caso.

45 Nueve fístulas de cuatro pacientes fueron inoculadas con ADSC después de tres o menos pases (FIGURA 3). Ocho fístulas fueron consideradas adecuadas para la retención en el ensayo y seguidas por al menos ocho semanas (FIGURA 3). En seis de las fístulas, la apertura externa había epitelizado a la semana 8 y estas fístulas fueron consideradas curadas (75%) (FIGURA 6). Las otras dos sólo tuvieron un encierro incompleto de la apertura externa, con una disminución en el flujo de salida, según lo informado por los pacientes (25%; no sanados; (FIGURA 3). No hubo ninguna relación directa entre el número de células inyectado o el tiempo de cultivo y el éxito del procedimiento. Tampoco hubo relación directa entre el género o la edad del paciente y la sanación. Los ensayos de subsecuencia realizados indican que una dosis inicial de 20 x 10⁶células es adecuada. Hemos determinado que una segunda dosis de 40 x 10⁶ células puede ser utilizada en el caso del fallo de la primera dosis. La dosis de células más altas es preferible porque hemos observado que el mayor número de células tiene un mejor efecto terapéutico en la reparación de los tejidos.

50 Los procedimientos quirúrgicos y de implantación fueron realizados sin dificultad técnica adicional en todas las nueve fístulas tratadas. Ningunas reacciones adversas inmediatas (por ejemplo, la anafilaxis, las reacciones alérgicas) fueron observadas en cualquiera de los casos estudiados.

55 Dos muestras histopatológicas fueron obtenidas siete meses (fístula enterocutánea) y un año (fístula rectovaginal) después de la cirugía. Ninguna transformación fue detectada en una serie completa de secciones

histopatológicas.

Discusión

5 En un informe previo, describimos el exitoso tratamiento basado en las células de una mujer joven con una fístula rectovaginal recurrente que había sido insensible al tratamiento médico. Por lo tanto, hemos diseñado el presente ensayo clínico fase I para evaluar la viabilidad y la seguridad de tal trasplante de células madre estromales autólogas del tejido adiposo (con mejoras en el protocolo original) para el tratamiento de las fístulas de Crohn insensibles, así como para probar el uso de las células madre estromales del tejido adiposo en conjunción con un pegamento de la fibrina.

10 Elegimos el tejido adiposo como fuente de células madre debido a su capacidad de diferenciación miógena y el hecho de que las fístulas responden bien a los trasplantes de músculos. Además, la grasa de liposucción está disponible en grandes cantidades y puede ser cosechada con mínimos efectos adversos en el paciente. Otros grupos han utilizado las células madre procedentes de la médula ósea pero, en tales casos, un procedimiento de movilización de las células es necesario que puede ser peligroso para algunos pacientes, tales como aquellos con una infracción del miocardio. En nuestro ensayo, todos los procedimientos de liposucción rindieron una cantidad de células clínicamente útiles con características de células madre.

15 Seguimos a nuestros pacientes según el programa programado, y observamos una curación completa en 6 de los 8 procedimientos. Es importante señalar que la enfermedad de Crohn proporciona las peores condiciones para un acercamiento quirúrgico a las fístulas debido a la fragilidad del tejido y los enormes problemas asociados con la curación en estos pacientes. Nuestros pacientes fueron elegidos porque habían sido insensibles al tratamiento médico y por lo menos dos procedimientos quirúrgicos previos, pero nuestro tratamiento pareció ser muy efectivo. Sin embargo, nuevos brotes de la enfermedad de Crohn todavía pueden producir nuevas fístulas en cualquier paciente que necesitarán ser tratadas nuevamente con las células autólogas criopreservadas de ese paciente.

20 El mecanismo biológico que subyace al éxito terapéutico del trasplante de ADSC es desconocido. Las células madre podrían diferenciarse en el tejido conectivo, muscular o cicatricial. Alternativamente, la secreción de los factores de crecimiento de las células madre podría facilitar la cicatrización de heridas. Vimos típico tejido cicatricial en las fístulas examinadas histopatológicamente pero no tenemos ninguna manera de distinguir a las células trasplantadas de las células locales del tejido conectivo. Observamos una curación completa en el 75% de los casos usando nuestro tratamiento.

35 **Referencias**

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, y inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente Americana Nº: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcripción y Traducción (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

1. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Perianal Crohn's Disease. Gastroenterology (2003) 125:1503-1507.

55 2. Levy C, Tremaine WJ. Inflamm Bowel Dis (2002) 8(2):106-11.

3. Pennincke F, D'Hoore A, Filez L. Acta Gastroenterol Belg (2001) 64(2):223-226.

60 4. Rius J, Nessim A, Noguera JJ, Wexner SD. Eur J Surg (2000) 166(3):218-222.

5. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Plastic Reconstr Surg (2002) 109(1): 199-209.

6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Tissue Eng (2001) 7(2): 211-228.

65 7. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Gomez-Garcia L et al. Int J Colorectal Dis (2003) 18:451-454.

8. Abkowitz JL. *New Engl J Med* (2002) 346(10): 770-772.
9. Matsubara H. *Lancet* (2004) 363:746-747.
- 5 10. Cowan CM, Shi YY, Aalami 00, et al. *Nat Biotechnol.* (2004) 22(5):560-7
11. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo MA. *New Eng J Med* (2003) 349: 1480-1481.
- 10 12. Osawa M., Hanada K., Hanada H. and Nakauchi H. (1996) *Science* 273, 242-245.
13. Morrison S.J., Uchida N. and Weissman I.L. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11,35-71.
14. Ivanova N.B., Dimos J.T., Schaniel C., Hackney J. A., Moore K.A., Lemischka* I.R. (2002) *Science* 298, 601-604.
- 15 15. Phillips RL. (2000) *Curr Top Microbiol Immunol.* 251, 13-19.
16. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002) *Science* 298, 597-600.
- 20 17. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary, AAlfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. (2003) *Cells Tissues Organs* 174 (3), 101-109.
18. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN, *Exp Hematol.* (1976) Sep;4(5):267-74.
- 25 19. Caplan AI *J Orthop Res.* (1991) Sep;9(5):641-50
20. Pittenger, M.F. et al. (1999) *Science* 284: 143-147
21. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME, *J Cell Sci.* (1992) Jun;102 (Pt 2):341-51
- 30 22. Yoo JU, Johnstone B, *Clin Orthop.* (1998) Oct;(355 Suppl):S73-81
23. Wakitani S. et al. (1995) *Muscle Nerve* 18: 1417-1426.
- 35 24. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI, *Bone.* 1992;13(1):81-8.
25. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR, *Exp Neurol.* (2000) Aug;164(2):247-56.
- 40 26. Rogers JJ, Young HE, Adkison LR, Lucas PA, Black AC Jr, *Am Surg.* (1995) Mar;61(3):231-6.
27. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM, *Exp Hematol.* (2002) Aug;30(8):896-904.
28. Caplan AI, Bruder SP, *Trends Mol Med.* (2001) Jun;7(6):259-64.
- 45 29. Stanford, C.M. et al. (1995) *J Biol Chem* 270: 9420-9428.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende células madre estromales derivadas de tejido adiposo, para su uso en el tratamiento de una fístula en un sujeto, en donde dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo se preparan mediante un método que comprende: (a) recoger tejido adiposo de un sujeto; (b) obtener una suspensión celular mediante digestión enzimática; (c) sedimentar la suspensión celular y resuspender las células en un medio de cultivo; (d) cultivar las células durante al menos 10 días; y (e) expandir las células durante al menos cuatro pases de cultivo.
- 10 2. El uso de células madre estromales derivadas de tejido adiposo en la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una fístula en un sujeto, en donde dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo se preparan mediante un método que comprende: (a) recoger tejido adiposo de un sujeto; (b) obtener una suspensión celular mediante digestión enzimática; (c) sedimentar la suspensión celular y resuspender las células en un medio de cultivo; (d) cultivar las células durante al menos 10 días; y (e) expandir las células durante al menos
- 15 cuatro pases de cultivo.
- 20 3. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en donde dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo se pasan al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, o al menos diez veces
- 25 4. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 1 o 3, o el uso de la reivindicación 2 o 3, en donde dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo se cultivan durante al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, o al menos 30 días.
- 30 5. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-4, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde:
- (i) la fístula es una fístula intestinal, y en donde opcionalmente la fístula es una fístula rectovaginal, una fístula enteroenteral, una fístula enterocutánea o una fístula enterovaginal;
- (ii) la fístula es una fístula vaginal o uterina, y en donde opcionalmente la fístula es una fístula cervical, una fístula rectovaginal, una fístula enterovaginal o una fístula vesicovaginal;
- (iii) la fístula es una fístula anorrectal, fístula-en-ano, fístula fecal, fístula arteriovenosa, fístula biliar, fístula cervical, fístula craneosinosa, fístula enteroenteral, fístula enterocutánea, fístula enterovaginal, fístula gástrica, fístula metroperitoneal, fístula perilinfa, fístula arteriovenosa pulmonar, fístula rectovaginal, fístula umbilical, fístula traqueoesofágica, fístula vesicovaginal, o fístula perianal; o
- (iv) la fístula es una fístula anorrectal, enterorrectal, enterocutánea, rectovaginal o vesicovaginal.
- 35 6. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-5, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la fístula es una fístula de Crohn.
- 40 7. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-6, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde:
- (i) dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo son alogénicas con respecto al sujeto a tratar; y/o
- (ii) las células madre estromales derivadas de tejido adiposo son células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano.
- 45 8. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-7, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde:
- (i) dicha composición farmacéutica se administra como una primera dosis al orificio interno cerrado del tracto de la fístula después de cerrar el orificio interno con una sutura, y se administra una segunda dosis de dicha composición farmacéutica a uno o más sitios en las paredes del tracto de la fístula después de dicha primera dosis de dicha composición farmacéutica;
- (ii) dicha composición farmacéutica se administra como una primera dosis en uno o más sitios en las paredes del tracto de la fístula después de cerrar el orificio interno del tracto de la fístula con una sutura, y se administra una segunda dosis de dicha composición farmacéutica al orificio interno suturado cerrado;
- (iii) dicha composición farmacéutica se administra como una primera dosis en el orificio interno cerrado del tracto de la fístula después de cerrar el orificio interno con una sutura, y se administra una segunda dosis de dicha composición farmacéutica en el orificio interno suturado cerrado; o
- (iv) dicha composición farmacéutica se administra como una primera dosis en uno o más sitios en las paredes del tracto de la fístula después de cerrar el orificio interno del tracto de la fístula con una sutura, y se administra una segunda dosis de dicha composición farmacéutica a uno o más sitios en las paredes del tracto de la fístula después de dicha primera dosis de dicha composición farmacéutica.
- 50 55 60 65

9. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-8, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde:

- 5 (i) la composición farmacéutica comprende al menos 10×10^6 , al menos 20×10^6 , al menos 30×10^6 , o al menos 40×10^6 , células madre estromales derivadas de tejido adiposo;
- (ii) el tratamiento comprende administrar al menos 10×10^6 , al menos 20×10^6 , al menos 30×10^6 , o al menos 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo; y / o
- 10 (iii) la concentración de dichas células madre estromales derivadas de tejido adiposo en la composición es de al menos 5×10^6 células/ml.

10. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el tratamiento comprende: (a) cerrar el orificio interno de la fístula con una sutura y (b) administrar al menos 10×10^6 , al menos 20×10^6 , al menos 30×10^6 o al menos 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo al orificio interno suturado cerrado.

15. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 10, o el uso de la reivindicación 10, en donde el tratamiento comprende además: (c) administrar una segunda dosis de al menos 20×10^6 , al menos 30×10^6 , o al menos 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo al orificio interno suturado cerrado.

20. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el tratamiento comprende:

- 25 (i) el raspado profundo de por lo menos un tracto de la fístula, opcionalmente en donde el paso (i) se lleva a cabo raspando en profundidad todas las pistas de fístula a tratar y se produce un sangrado inducido al raspar las paredes de la fístula para obtener fibrina natural que llenará el tracto de la fístula;
- (ii) cerrar el orificio interno de la pista raspada con una sutura; y
- (iii) administrar al menos 10×10^6 , al menos 20×10^6 , al menos 30×10^6 o al menos 40×10^6 células madre estromales derivadas de tejido adiposo al orificio interno suturado cerrado.

30. La composición farmacéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-12, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde:

- 35 (i) al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo expresan los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y/o CD105; y/o
- (ii) menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1%, de las células madre estromales derivadas del tejido adiposo expresan los marcadores CD34, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y/o CD133.

40. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-12, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde las células madre estromales derivadas de tejido adiposo expresan los marcadores CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49A, CD51, CD54, CD55, CD58, CD59, CD90 y CD105 y no expresan los marcadores CD34, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD31, CD45, CD49f, CD102, CD104, CD106 y/o CD133.

45. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-12, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-12, en donde:

- 50 (i) al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, de las células madre estromales derivadas de tejido adiposo expresan los marcadores c-Kit, vimentina y/o CD90;
- 55 (ii) menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2% o menos del 1% de las células madre expresan los marcadores CD34, Factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100 y/o queratina; o
- (iii) las células madre estromales derivadas de tejido adiposo expresan los marcadores c-Kit, vimentina y CD90 y no expresan los marcadores CD34, Factor VIII, alfa-actina, desmina, S-100 y queratina.

60

65

FIG. 1

Antígeno	P1	P3	P4	P6	P7	P9
CD 34 (marcador células madre)	+	+/-	-	-	-	-
CD 90 (marcador células madre; fibroblastos)	+	++	++	+++	+++	+++
c-Kit (marcador células madre)	+	+	++	+++	+++	+++
Factor VIII (marcador de diferenciación)	+	+/-	+/-	-	-	-
Alfa-actina (marcador de células vasculares de músculo blandas)	+	+	+/-	-	-	-
Vimentin (marcador de origen mesodermo; células mesenquimales)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Desmin (marcador de origen mesodermo; células musculares)	+	-	-	-	-	-
S-100 (marcador de origen neuroectodermo)						
Keratina (marcador de origen ectodermo)						

FIG. 2

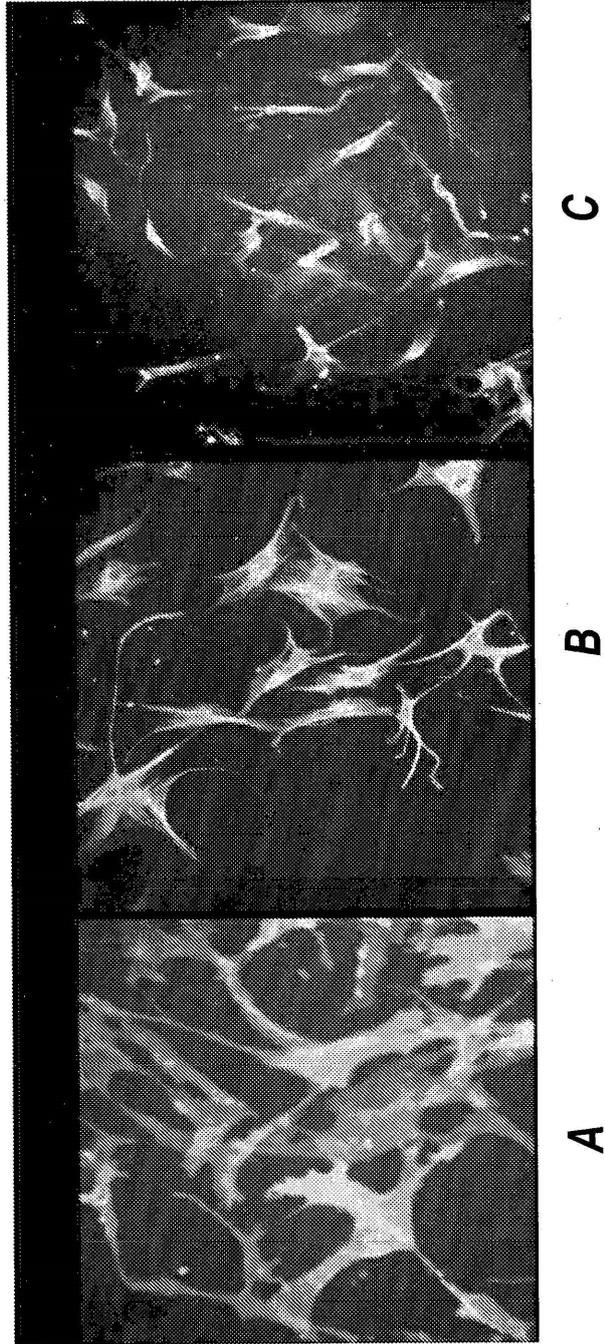


FIG. 3

Implante N°	Paciente N°	Edad (años)	Género	Tipo de fistula	Pase N°	Tiempo Cultivo (días)	Número de Célula (x10 ⁶)	Resultado
1	001	35	F	Recto-vaginal	1	6	6.1	Curado
2	002	40	F	Enterocutánea línea media	1	9	9.0	Curado
3	002	40	F	Enterocutánea Periumbilical	1	7	8.0	NA
NI	003	36	M	Perineal	1	NA	NI	NA
4	002	40	F	Recto-vaginal	2	14	10.0	No Curado
5	002	41	F	Enterocutánea Suprapúbica	2	8	3.5	Curado
6	001	37	F	Rectovaginal	1	12	20.0	Curado
7	004	36	M	Enterocutánea cuadrante inferior derecho	2	16	30.0	No Curado
8	005	32	M	Perineal	2	31	20.0	Curado
9	002	41	F	Enterocutánea cuadrante inferior derecho	3	12	15.0	Curado

FIG. 4

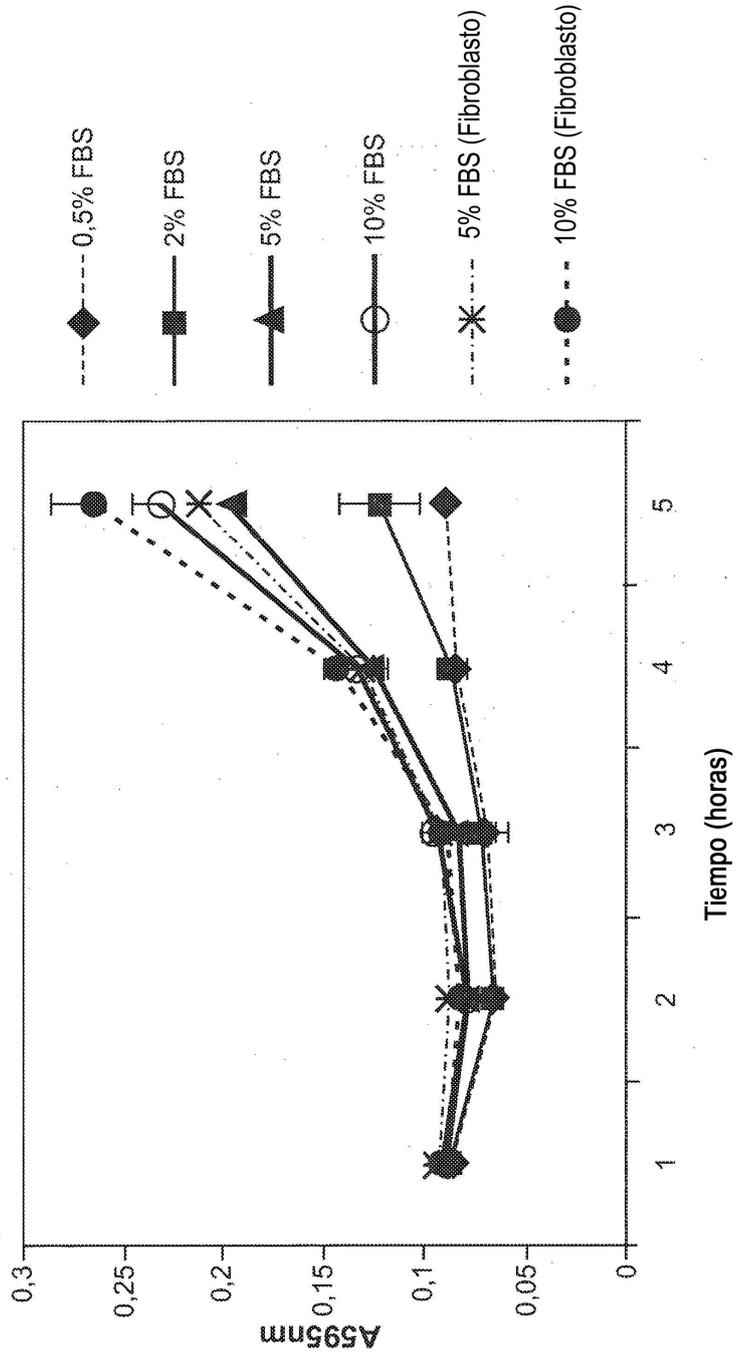
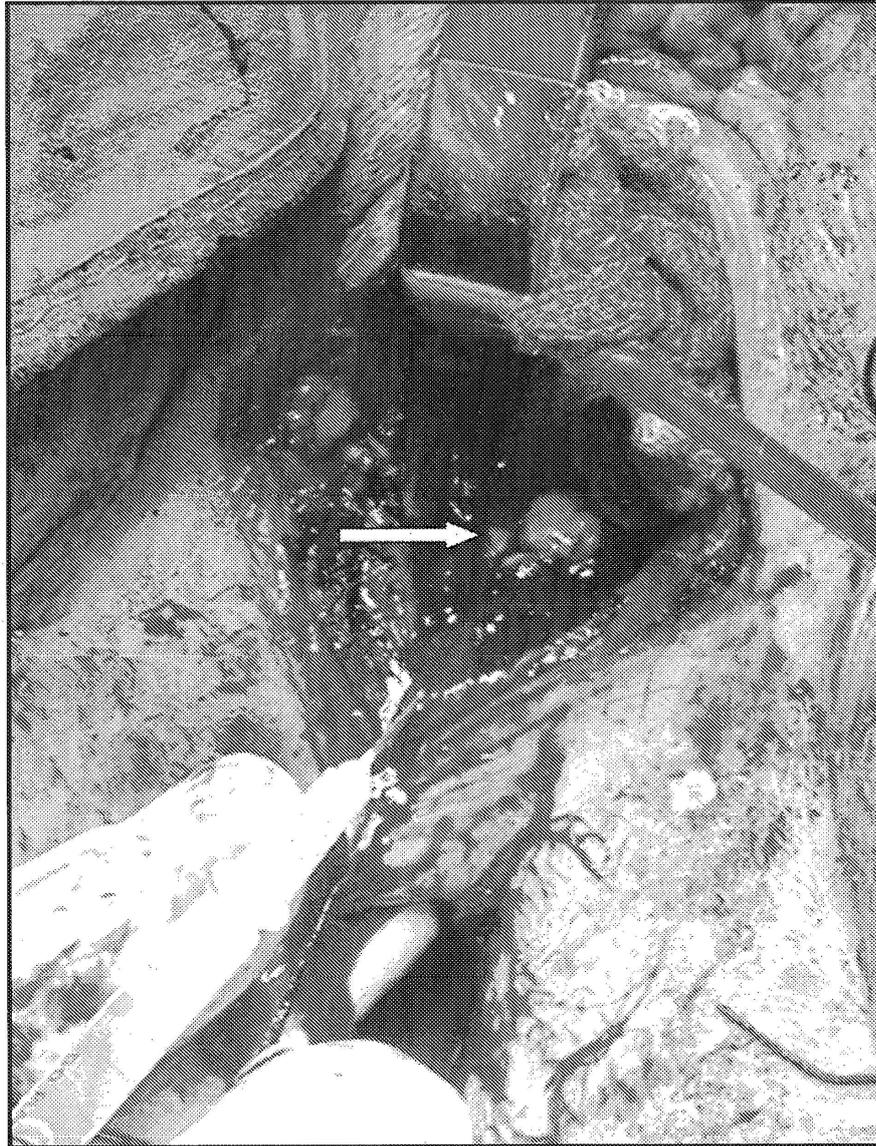


FIG. 5



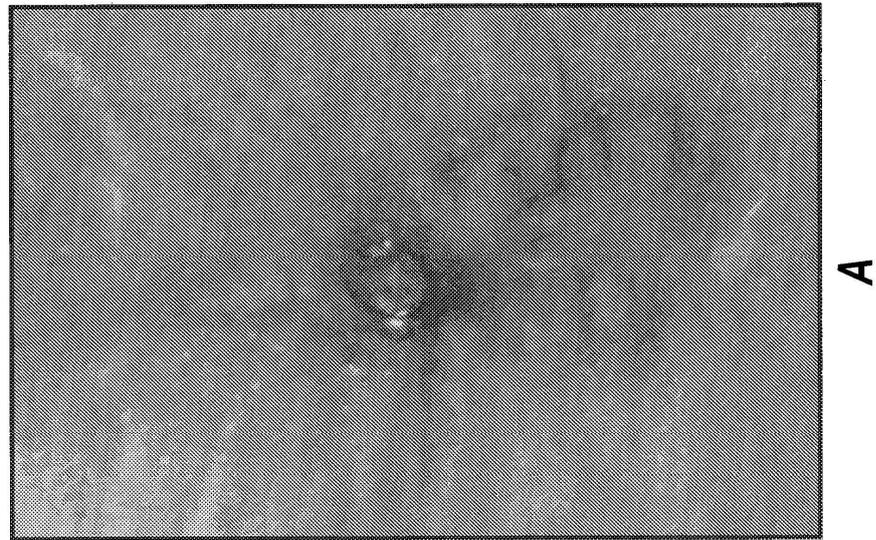


FIG. 6

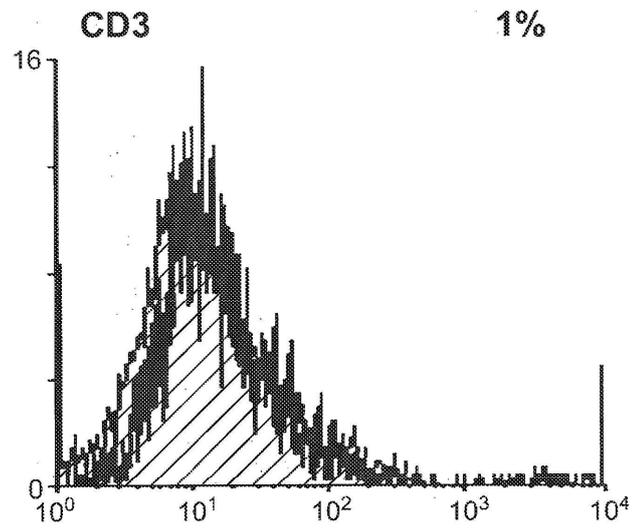
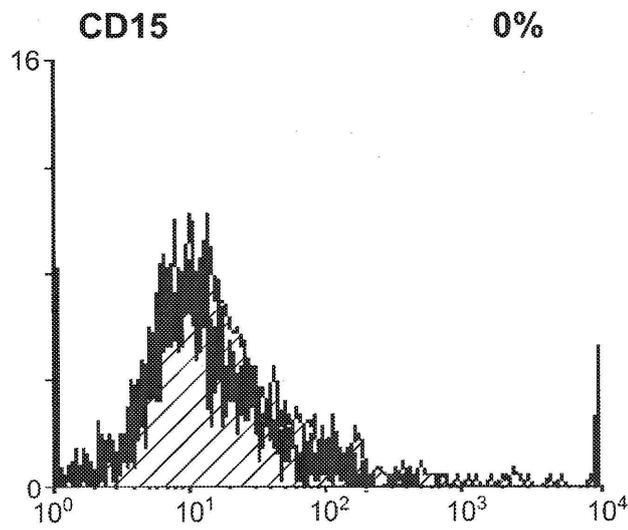


FIG. 7A



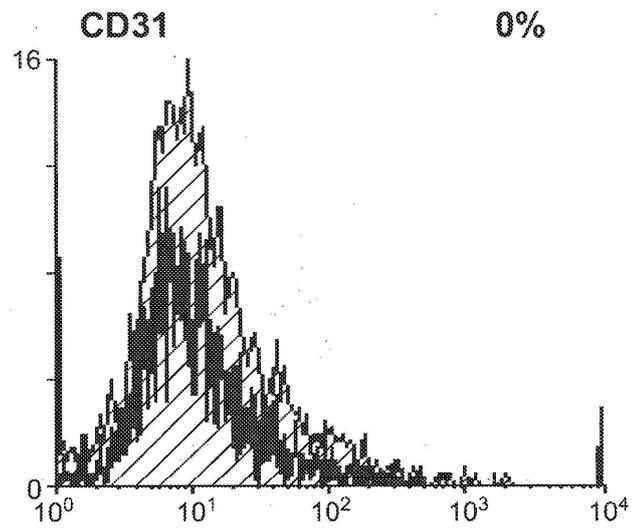
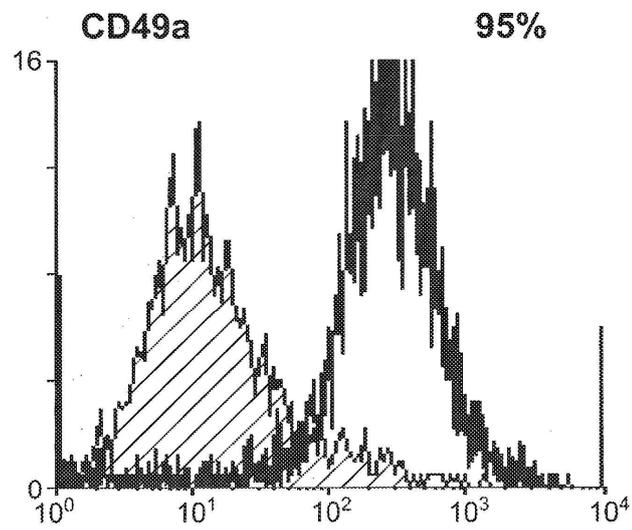


FIG. 7A(cont.)



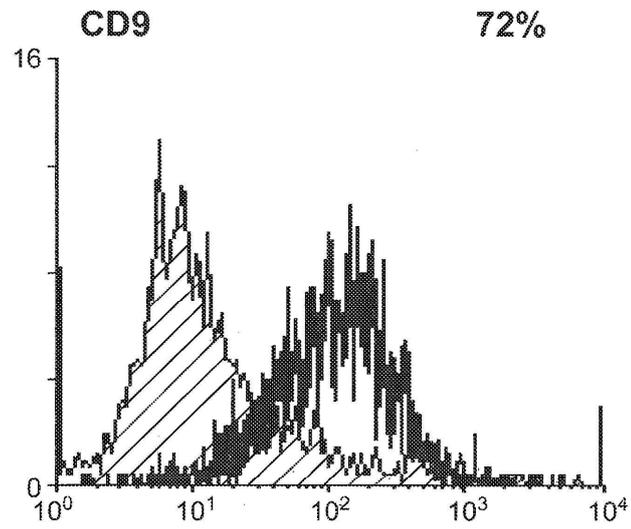
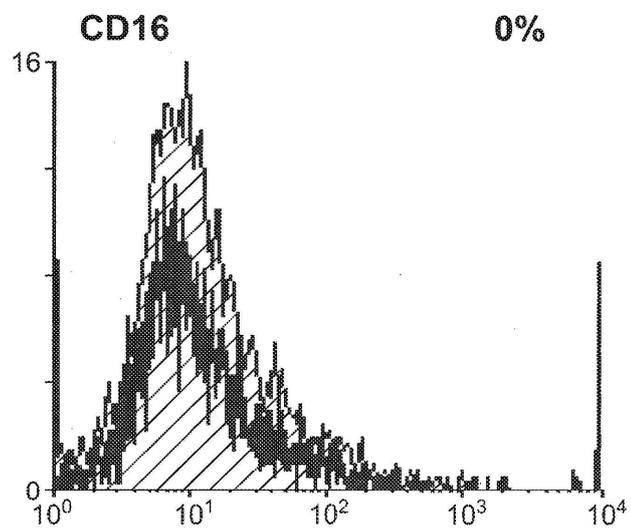


FIG. 7A(cont.)



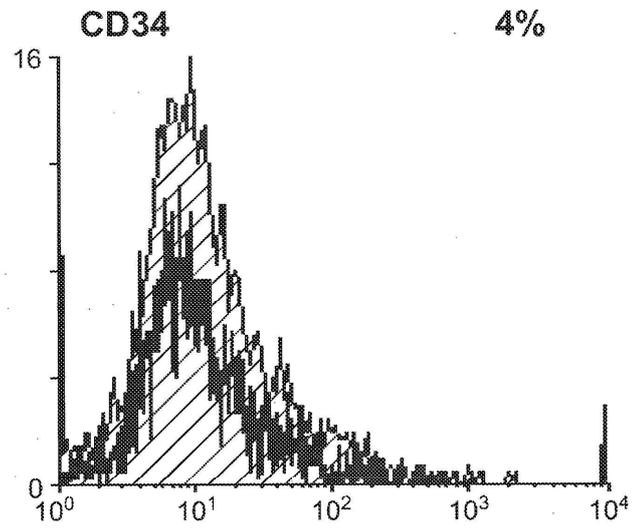
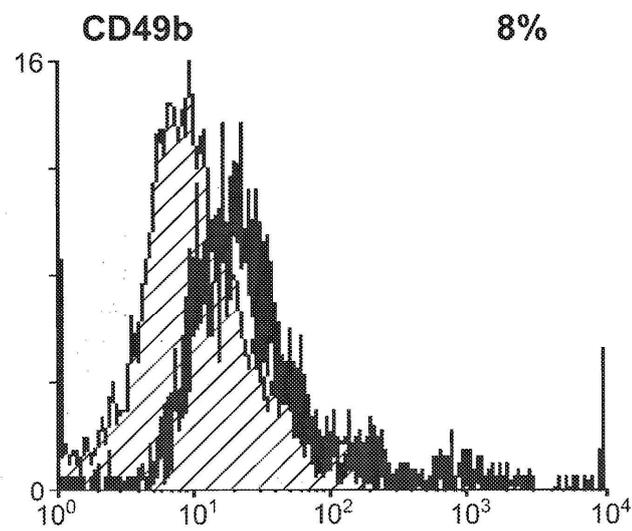


FIG. 7A(cont.)



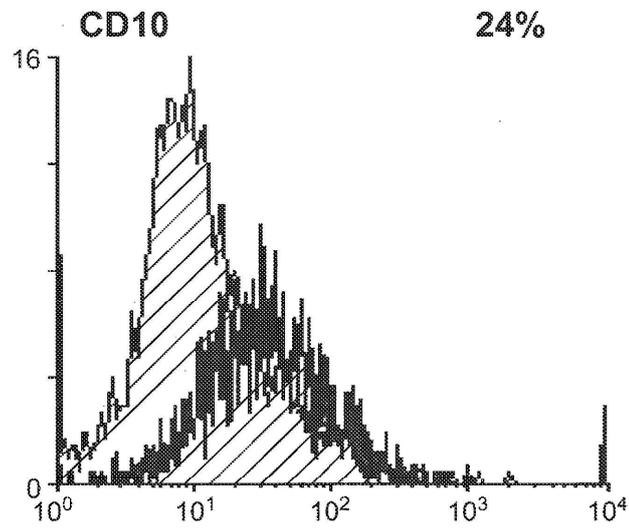
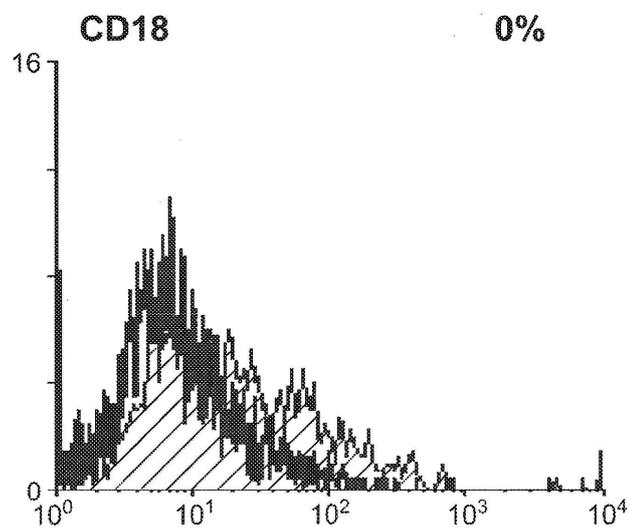


FIG. 7A(cont.)



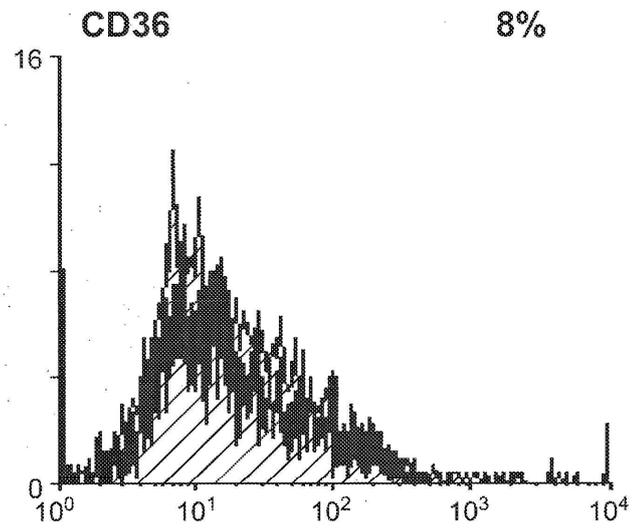
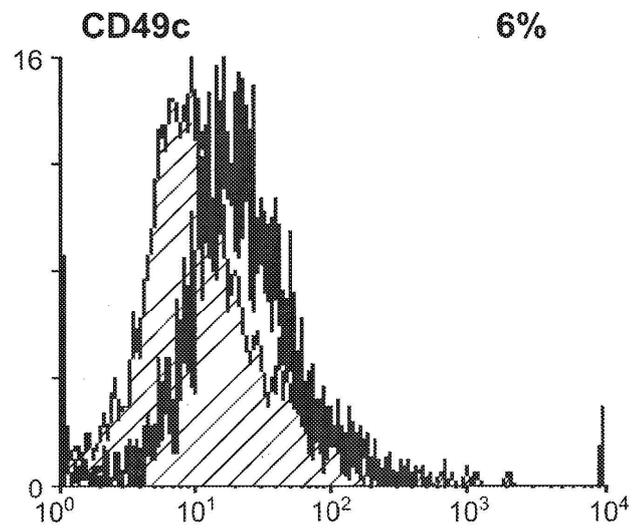


FIG. 7A(cont.)



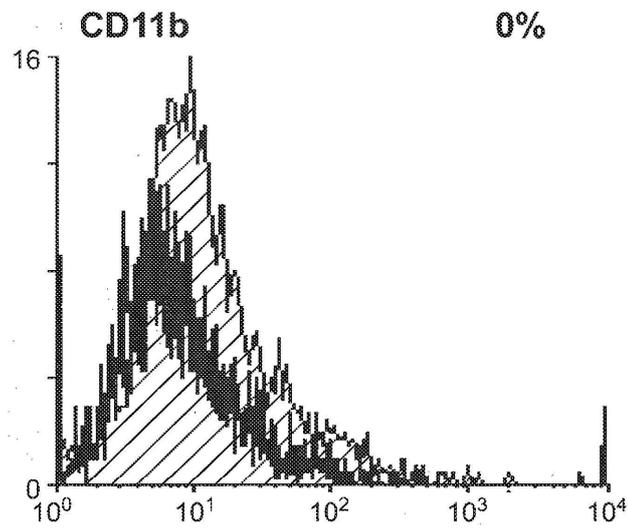
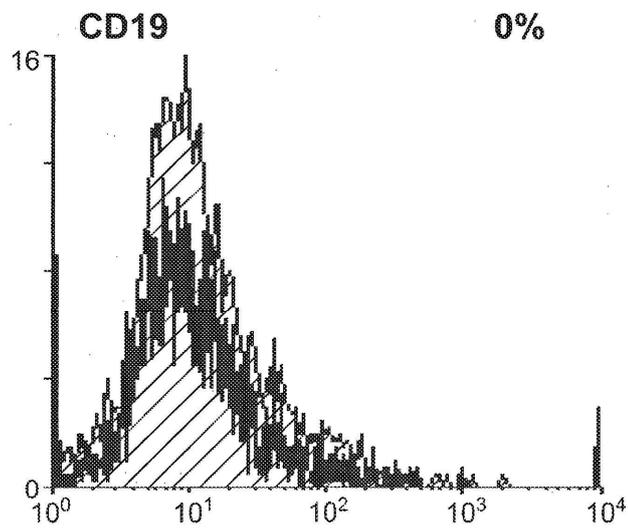


FIG. 7A(cont.)



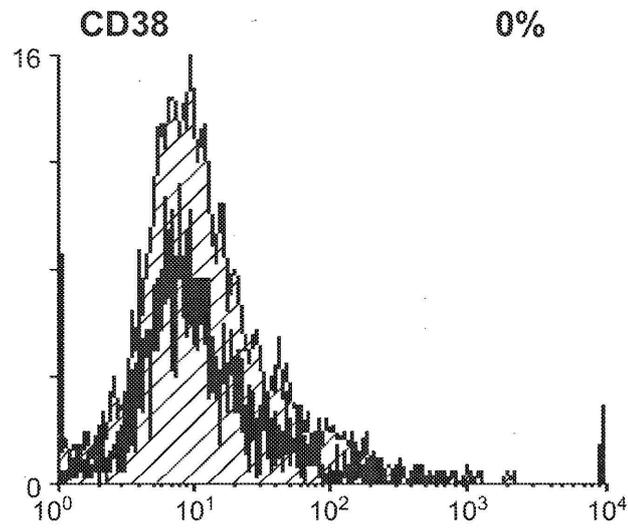
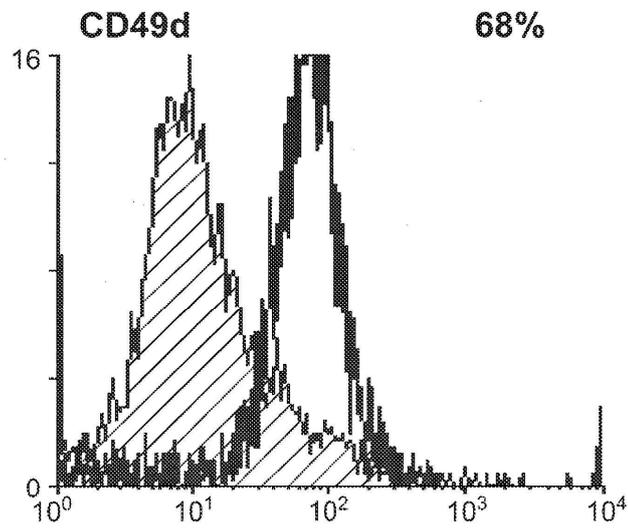


FIG. 7A(cont.)



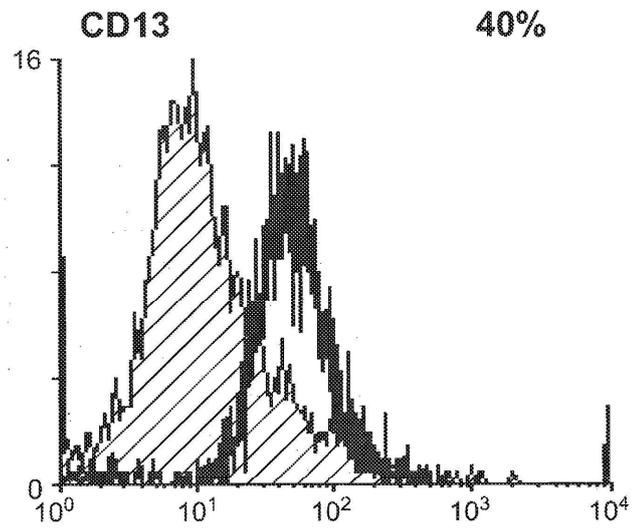
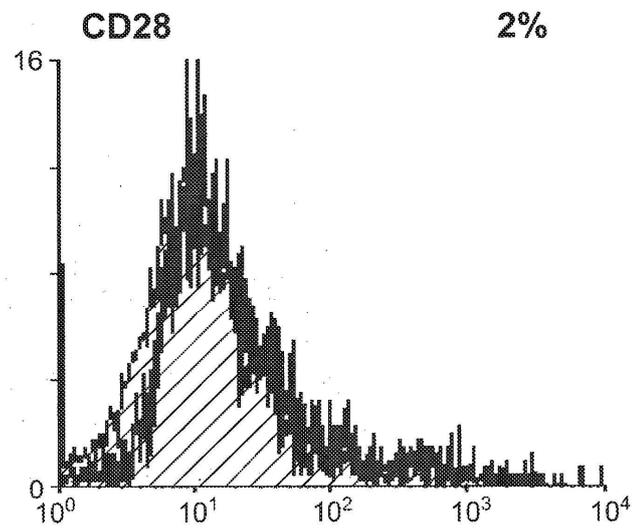


FIG. 7A(cont.)



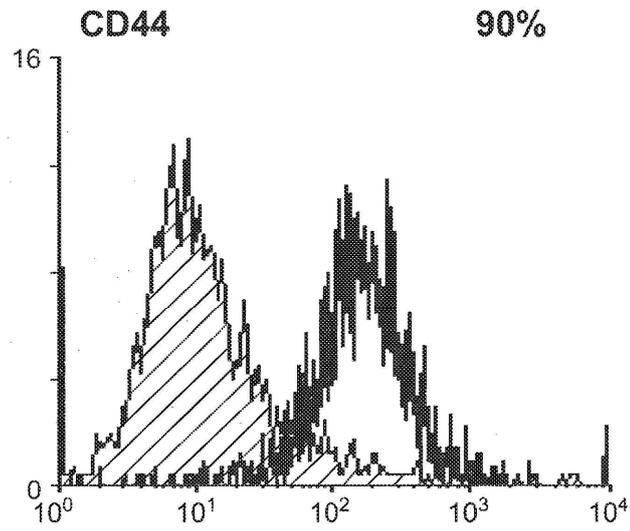
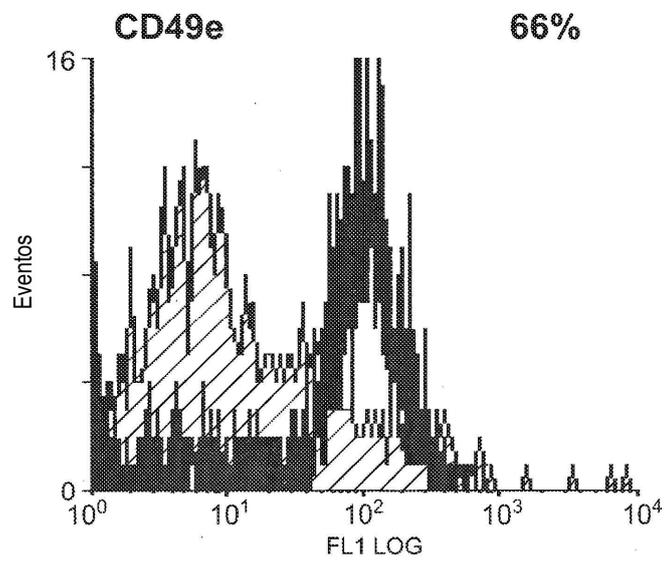


FIG. 7A(cont.)



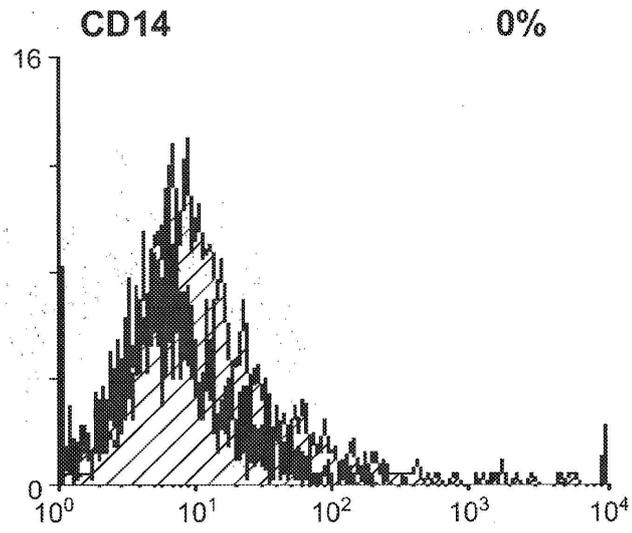
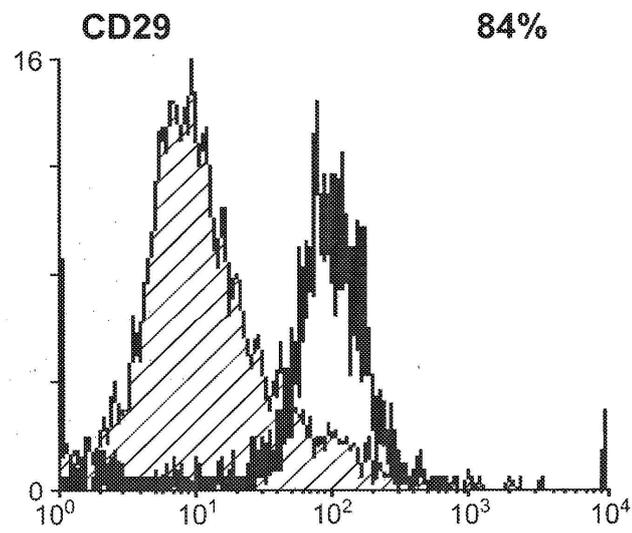


FIG. 7A(cont.)



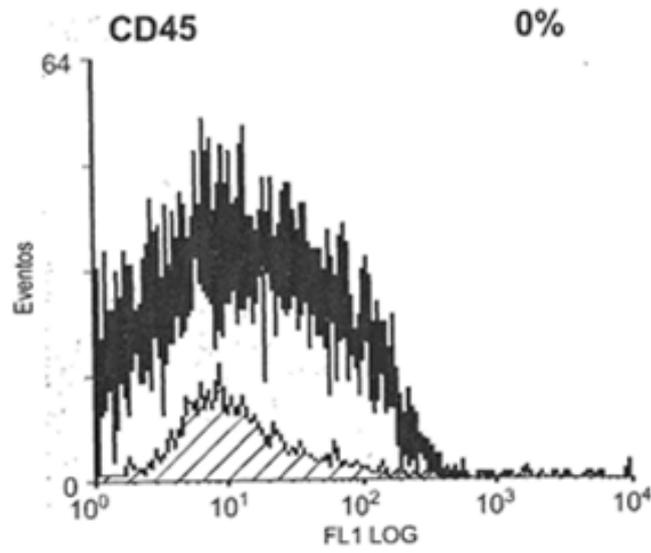
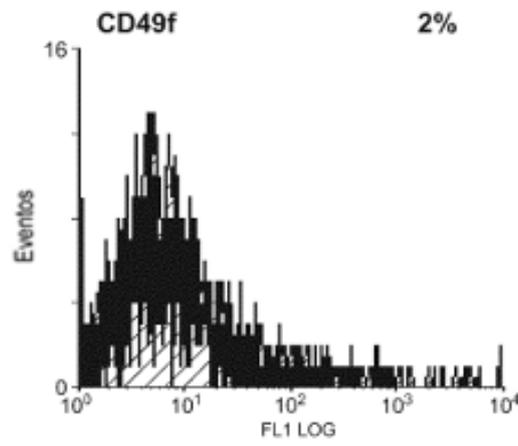


FIG. 7A(cont.)



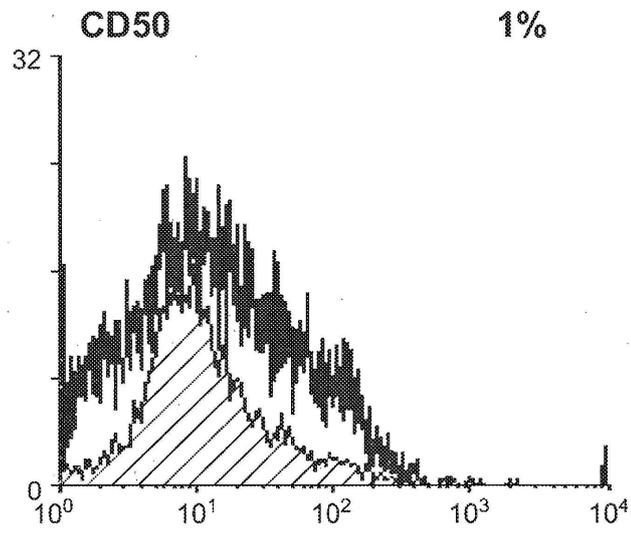
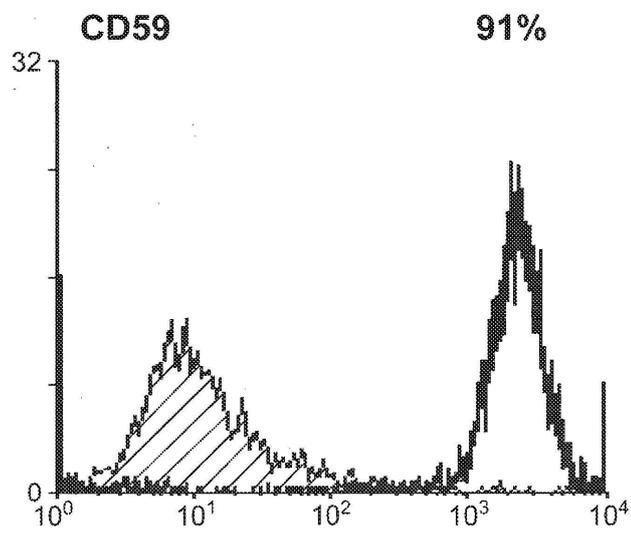


FIG. 7B



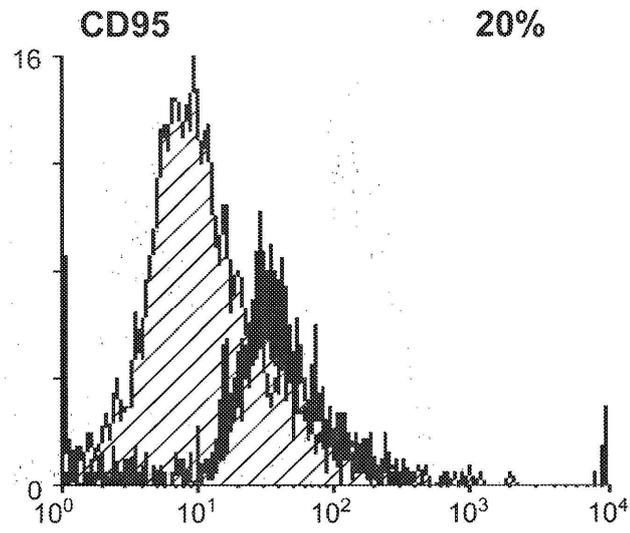
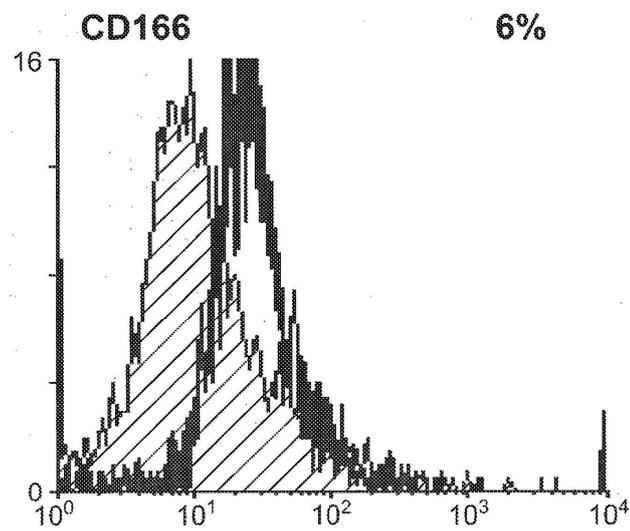


FIG. 7B(cont.)



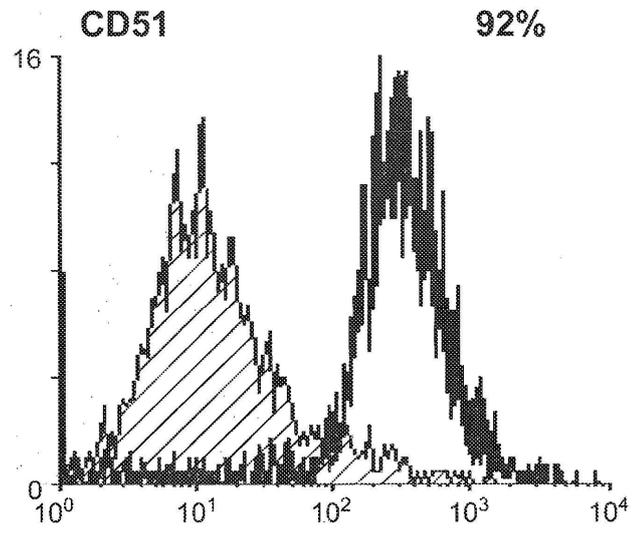
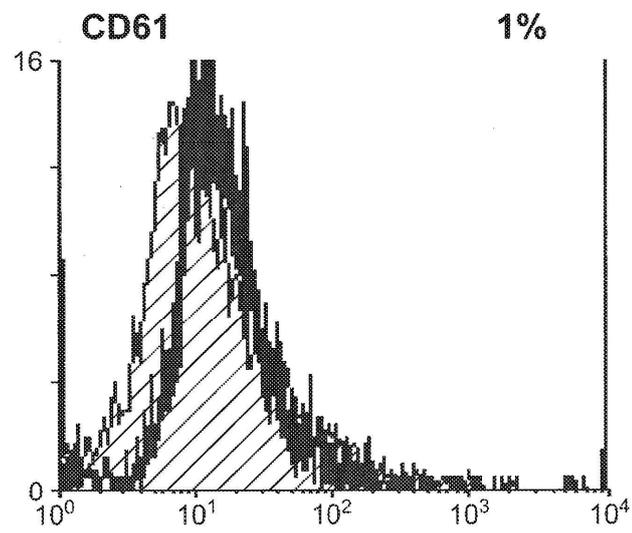


FIG. 7B(cont.)



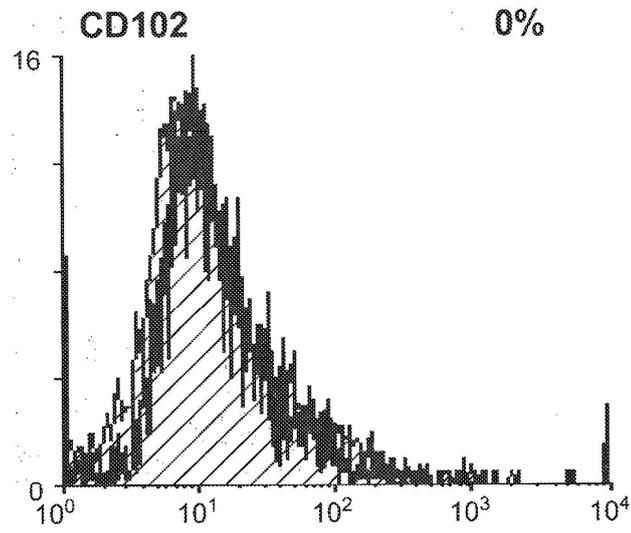
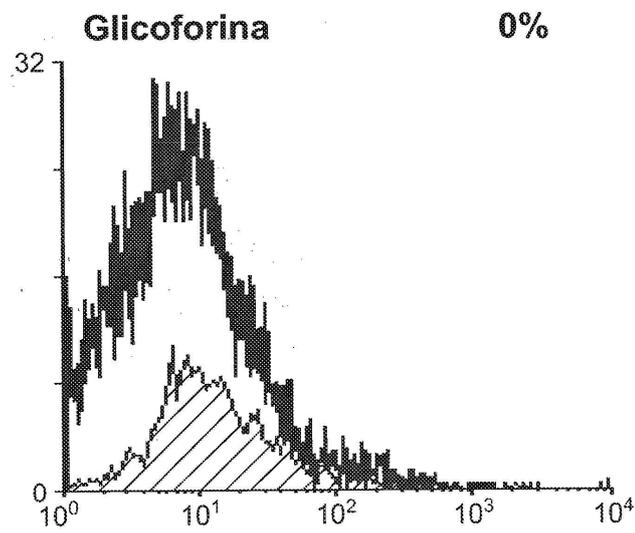


FIG. 7B(cont.)



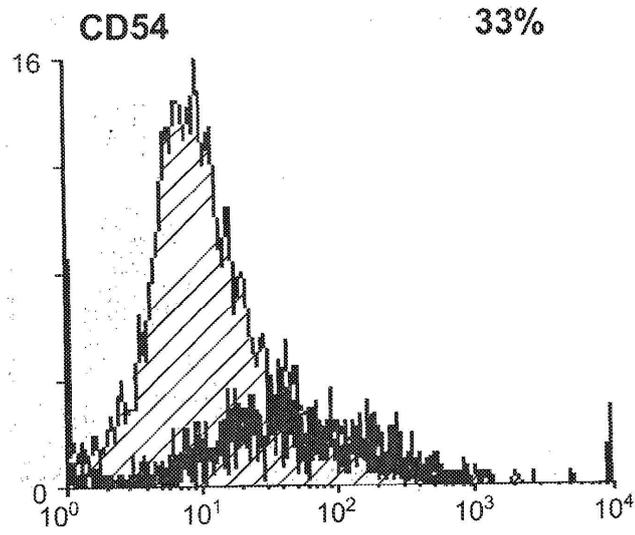
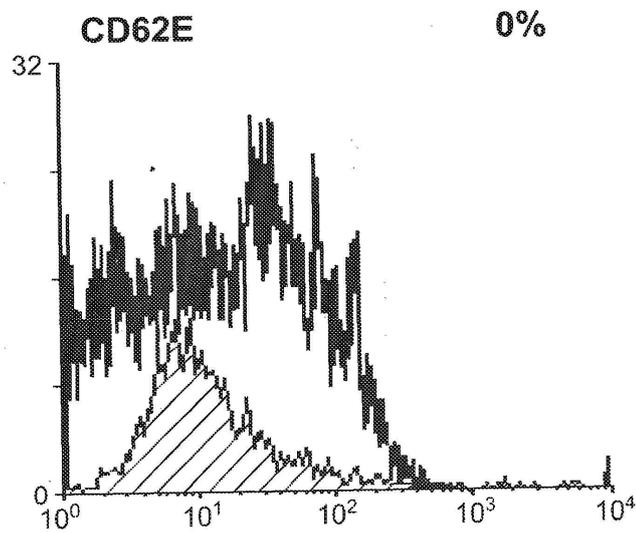


FIG. 7B(cont.)



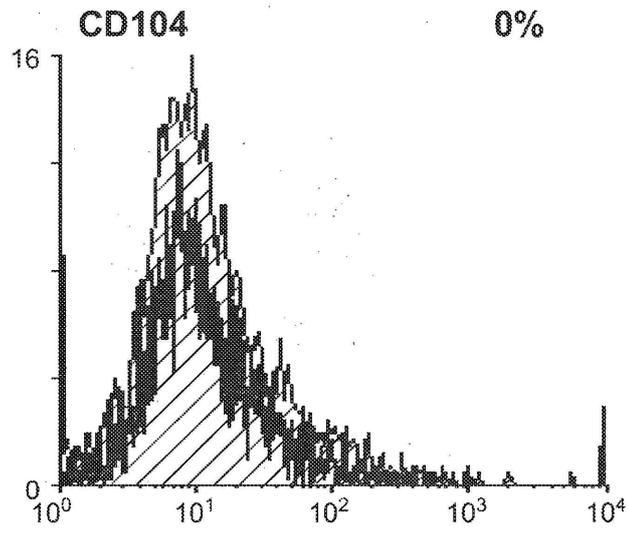
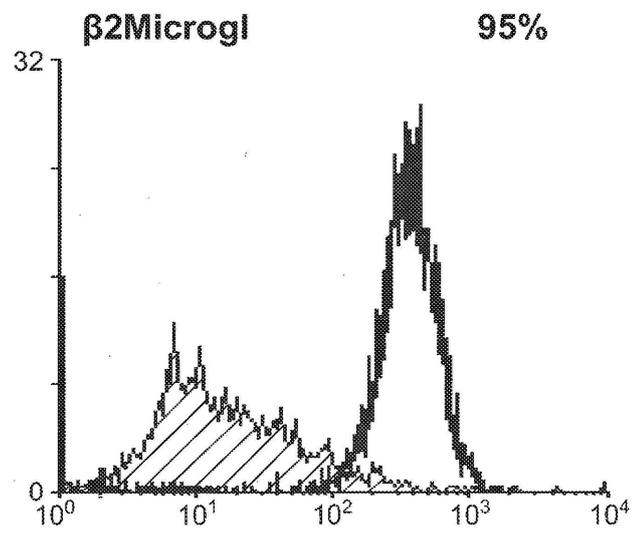


FIG. 7B(cont.)



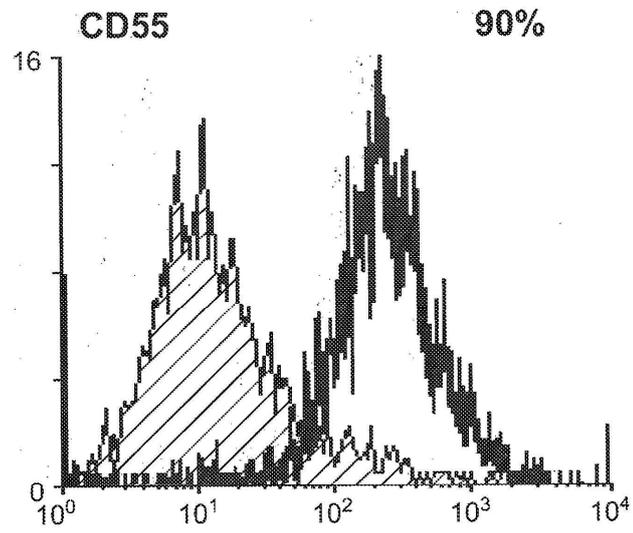
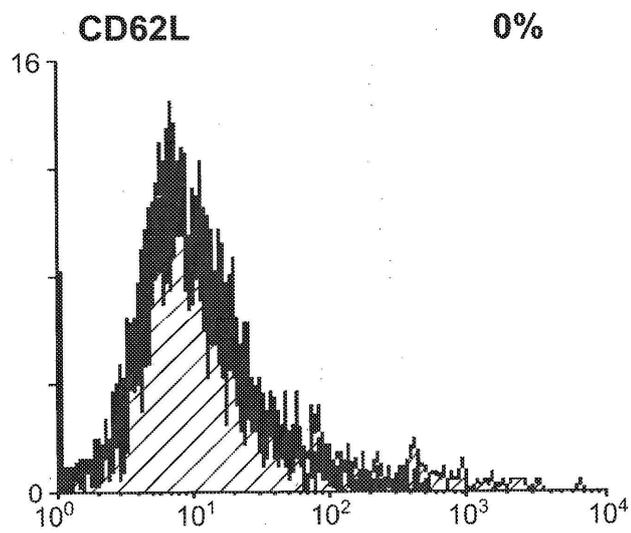


FIG. 7B(cont.)



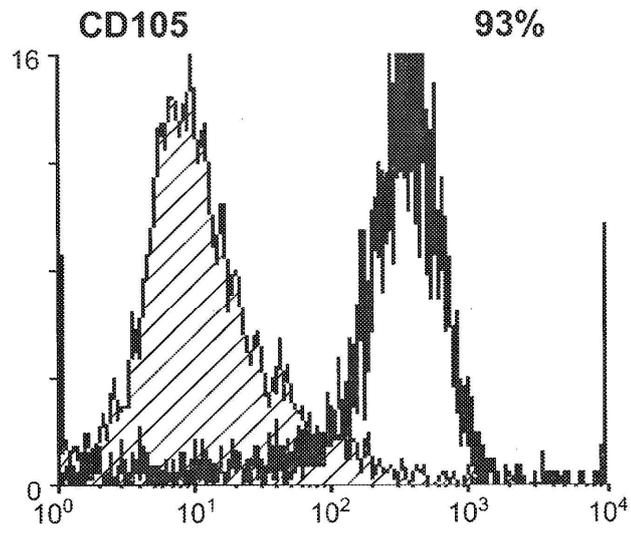
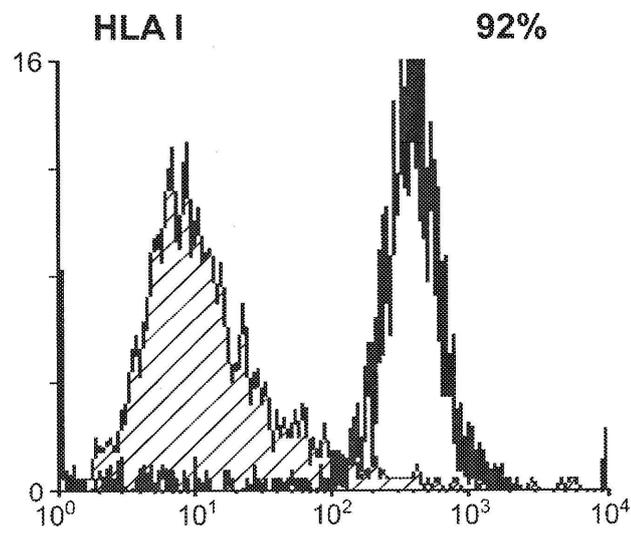


FIG. 7B(cont.)



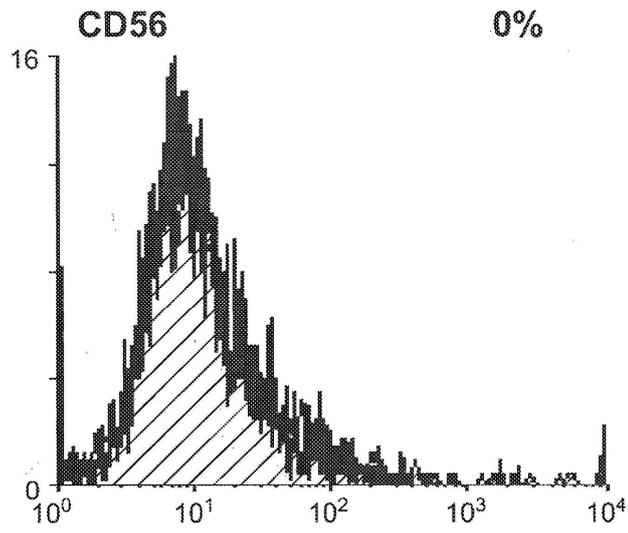
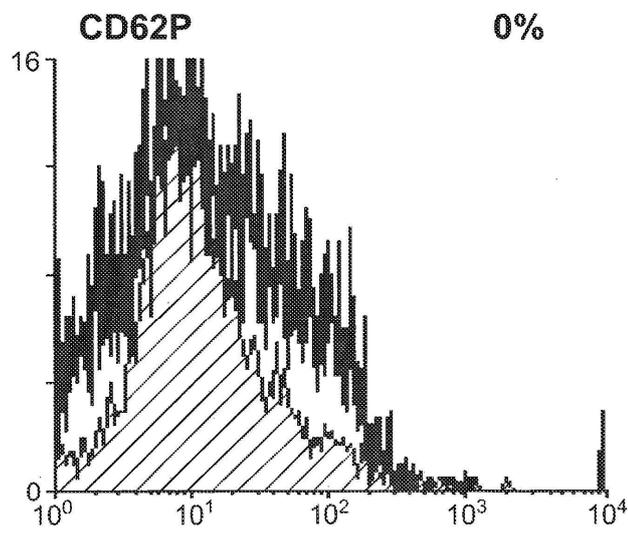


FIG. 7B(cont.)



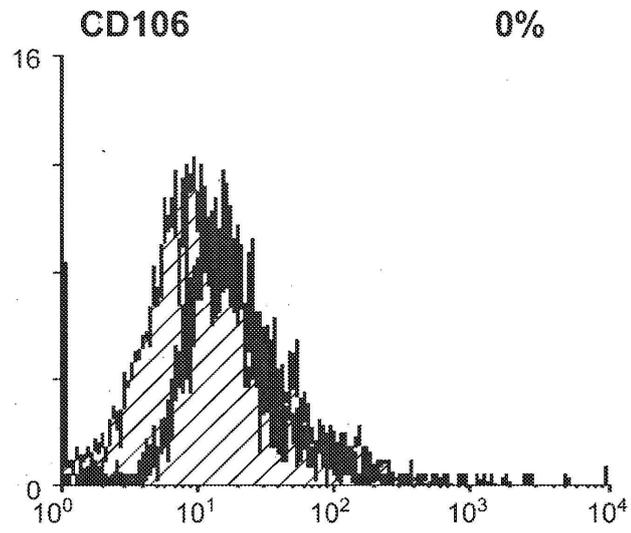
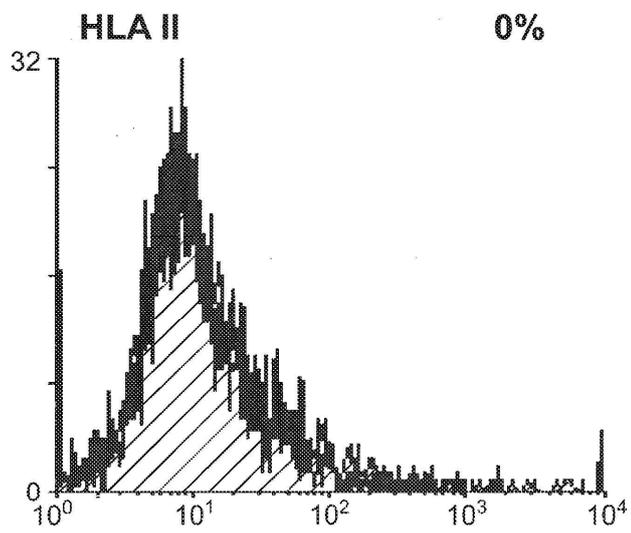


FIG. 7B(cont.)



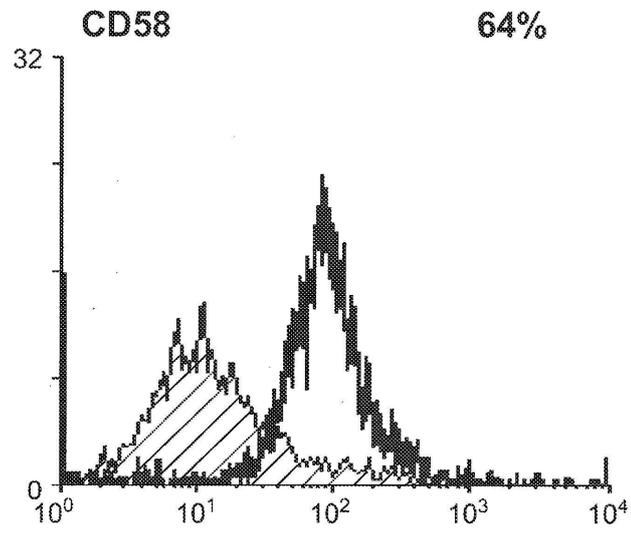
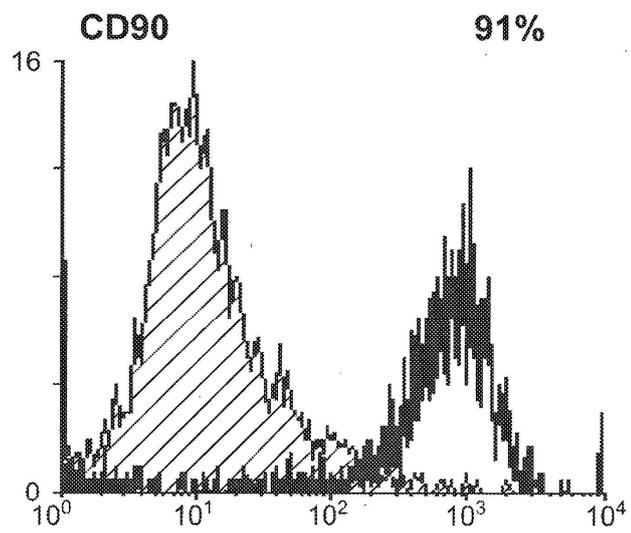


FIG. 7B(cont.)



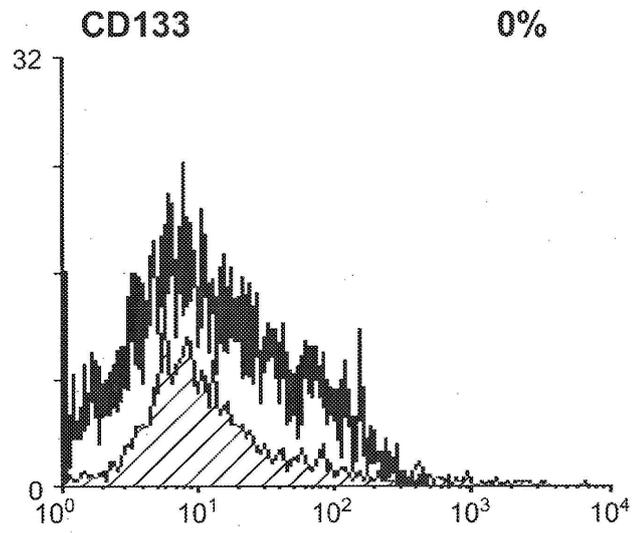


FIG. 7B(cont.)

