

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 640**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/16 (2015.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014 PCT/EP2014/072911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014 E 14789278 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3060653**

54 Título: **Procedimiento de reducción de la actividad inflamatoria de un trasplante de células madre y usos del mismo**

30 Prioridad:
24.10.2013 EP 13190120

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2019

73 Titular/es:
NEUROPLAST BEHEER B.V. (100.0%)
Oxfordlaan 55
6229 EV Maastricht, NL

72 Inventor/es:
MUNTER, DE, JOHANNES PETRUS JOZEF MARIA;
LANG, EKKEHARD;
WOLTERS, ERIK CHARLES MARIE JOSEPH y
HAAN, DE, PETRUS THEODORUS

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 640 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

Procedimiento de reducción de la actividad inflamatoria de un trasplante de células madre y usos del mismo

Campo de la invención

- 5 La invención está en el campo de la terapia celular, más particularmente en la terapia por trasplante de células madre. La divulgación proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la eficacia del trasplante de células madre proporcionando medios y procedimientos para la reducción de la actividad inflamatoria de un trasplante de células madre. La divulgación también proporciona medios y procedimientos para la obtención de un trasplante de células madre con una actividad inflamatoria reducida.

Antecedentes de la invención

- 10 La capacidad de los tejidos y órganos para regenerarse a lo largo de la vida es el resultado de la presencia de células madre residentes en el tejido. Durante la homeostasis, las células mueren debido a la muerte celular programada o apoptosis y son repuestas por células que descienden de las células madre. La división de las células madre da como resultado una nueva célula madre que se diferencia en una célula tisular madura cuando se le proporcionan señales moleculares apropiadas.
- 15 Después de una herida o una infección patógena, sin embargo, las células en el tejido lesionado o infectado se necrosan y liberan patrones moleculares asociados a peligro o asociados al patógeno (DAMP o PAMP), respectivamente. Estos patrones moleculares inducen procesos inflamatorios en el sitio de la lesión o la infección. Durante la fase aguda de la inflamación tisular se producen proteínas en el hígado y se secretan en el plasma sanguíneo.
- 20 Las proteínas de fase aguda que incluyen el fibrinógeno y la proteína C reactiva activan el sistema de complemento, macrófagos y células del sistema inmunitario adaptativo. La inflamación promueve la hemostasia y recluta y activa las células del sistema inmunitario innato y adaptativo, dando lugar a la coagulación sanguínea y la retirada de las células lesionadas o infectadas. Después de esto, la inflamación se detiene, la homeostasis se restaura y el tejido dañado se repara reponiéndolo con descendientes de células madre. En caso de que el daño celular se extienda de un cierto límite o en el caso de que la infección se vuelva crónica, los niveles en plasma de las proteínas de fase aguda se mantienen elevados y la inflamación se exagera, lo que da como resultado el depósito excesivo de amiloides (formación de placas) y colágeno (tejido cicatricial) dando lugar a una pérdida significativa de función del tejido/órgano afectado.
- 25 Los pacientes con ciertos cánceres de la sangre o la médula ósea tales como el mieloma múltiple o la leucemia se tratan con trasplantes de células madre hematopoyéticas. En los trasplantes de células madre hematopoyéticas, el sistema inmunitario del receptor se destruye con radiación o quimioterapia antes del trasplante con los trasplantes de células madre (allogénicos) de otro individuo (el donante). El trasplante allogénico de células madre hematopoyéticas para restaurar la hematopoyesis en el receptor sigue siendo un procedimiento peligroso con la enfermedad del injerto contra el huésped como la complicación principal. La enfermedad del injerto contra el huésped es una enfermedad inflamatoria en la que las células y componentes con una capacidad proinflamatoria, tal como las células del sistema inmunitario y las proteínas de fase aguda, presentes en el trasplante, atacan las células del receptor. Esto puede ocurrir incluso si el donante y el receptor tienen proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) idénticas en su superficie, debido a que el sistema inmunitario sigue reconociendo otras diferencias menores entre las proteínas de superficie del donante y el receptor. Además, la destrucción del sistema inmunitario de los receptores mediante radiación o quimioterapia antes del trasplante de células madre da como resultado la acumulación de un gran número de células necróticas en la médula ósea, que aumenta la respuesta del injerto contra el huésped.
- 30 La necrosis celular y la inflamación es un factor principal del daño tisular después de agresiones del sistema nervioso central y las enfermedades neurodegenerativas. La lesión del sistema nervioso central incluyendo el ictus isquémico, lesión cerebral traumática y lesión traumática de la médula espinal representan una carga principal del sistema de salud en todo el mundo. Las agresiones isquémicas y traumáticas del sistema nervioso central dan como resultado una incapacidad crónica definitiva con una esperanza de vida discapacitada. En la actualidad, los defectos postraumáticos del sistema nervioso central, tales como las lesiones de la médula espinal y cerebrales, no se pueden tratar, ni se pueden curar los defectos histológicos subyacentes.
- 35 La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son afecciones esporádicas que se caracterizan por la pérdida progresiva de células del sistema nervioso. Ejemplos de enfermedades degenerativas son la enfermedad de Parkinson, demencia de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis amiotrófica lateral y la esclerosis múltiple. La Organización Mundial de la Salud prevé que los trastornos neurodegenerativos superarán al cáncer para convertirse en la segunda causa de muerte. Los tratamientos disponibles para las enfermedades neurodegenerativas se orientan a la mejora de los síntomas, el alivio del dolor y el aumento de la movilidad. Sin embargo, hasta ahora las terapias disponibles actualmente para tratar pacientes con enfermedades neurodegenerativas, solo alivian los síntomas de la enfermedad y retrasan el tiempo de progresión a estadios discapacitantes.
- 40 45 50 55

Las terapias de trasplante de células madre implican células madre para recuperar la neurogénesis y proporcionar una

recuperación funcional, es una estrategia atractiva para tratar las enfermedades y trastornos del sistema nervioso. Las terapias de trasplante de células madre para recuperar la vascularización es una estrategia atractiva para tratar las enfermedades y trastornos isquémicos.

5 Las células madre obtenidas de los embriones, por ejemplo, las células madre embrionarias mantienen un gran potencial para la medicina regenerativa (Hentze H. y col., Trends in Biotechnology 25: 24-32, 2007), sin embargo, tienen varias desventajas incluyendo la posibilidad de rechazo del trasplante debido a su origen alogénico y la posible formación de teratomas en el caso de que las células no estén diferenciadas segura y cuantitativamente antes del trasplante.

10 Las células madre embrionarias tiene que cultivarse y en consecuencia tienen el riesgo de exposición a material xenógeno o contaminarse con células agotadas prematuramente (Mannello F. y Tonti GA, Stem Cells 25: 1603-1609, 2007). Debido a los limitados conocimientos de la biología de células madre embrionarias y su comportamiento en desarrollo actualmente no parece que sean suficientemente seguras para su aplicación en seres humanos.

15 Para el tratamiento de cánceres de la sangre o la médula ósea, el trasplante de células madre alogénicas derivadas de la médula ósea o sangre periférica es más eficaz. Para el tratamiento de enfermedades y trastornos del sistema nervioso central, el trasplante de células madre de adulto autólogas, principalmente de células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimáticas derivadas de la médula ósea o la sangre periférica se considera el más prometedor (Sykova E. y col., Cell Transplant 15: 675-687, 2006).

20 El estroma de la médula ósea alberga poblaciones heterogéneas de células multipotenciales incluyendo células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimáticas capaces de la autorrenovación y la diferenciación en distintas células y tejidos de los linajes hematopoyético y mesenquimático, respectivamente.

25 Los recientes trabajos preclínicos que investigan la fiabilidad de las terapias de trasplante de células madre para tratar pacientes con ictus isquémico, lesión cerebral traumática, y lesión traumática de la médula espinal han demostrado que cuando se aplican por vía intratecal, las células madre hematopoyéticas y/o células madre mesenquimáticas o descendientes de las mismas se sugiere que se infiltran dentro del tejido neural lesionado, penetran el tejido glial cicatrizado (Alison M.R., Journal of Pathology 217: 141-143, 2009), secretan factores tróficos (Caplan A.I. y Dennis J.E., Journal of Cellular Biochemistry 98: 1076-1084, 2006), son capaces de diferenciarse en neuronas funcionales (Zeng R. y col., Spine 36: 997-1005, 2011), promueven la formación de conexiones sinápticas (Bareyre F.M., Journal of Neurological Sciences 265: 63-72, 2008) y como resultado participan en la reorganización de la red neural dando lugar a una mejora funcional (Kwon B.K. y col., Experimental Neurology 248C: 30-44, 2013).

30 En los primeros estudios de trasplante con células madre, se utilizaban trasplantes de médula ósea, que se producían por centrifugación única o doble de biopsias de médula ósea (documento WO2007125420). La capa entre los eritrocitos y el plasma, llamada capa leucocitaria se recolectaba posteriormente. La capa leucocitaria contiene una población heterogénea de células nucleadas. Una parte significativa de dichas células nucleadas son células asociadas con la inmunidad con una capacidad proinflamatoria y el trasplante alogénico de estas células para recuperar la hematogénesis frecuentemente resultaba en la enfermedad del injerto contra el huésped como se ha establecido anteriormente. El trasplante autólogo de estas células en el tejido del sistema nervioso central dañado también puede dar lugar a efectos adversos e incluso perjudiciales para el modo de acción que se pretende (Le Blanc K.L. y col., Scandinavian Journal of Immunology 57: 11-20, 2003; Spaggiari G.M. y col., Blood 107:1484-1490, 2006; Adams R.A. y col., Journal of Experimental Medicine 204: 571-582, 2007; Assmus B. y col., Journal of the American College of Cardiology 55: 1385-1394, 2010; Beck K.D. y col., Brain 133: 433-447, 2010). Además, los agentes químicos utilizados durante la etapa de centrifugación en gradiente tienen que retirarse de los trasplantes introduciendo etapas de lavado adicionales para obtener el producto de trasplante final.

35 La separación de las células madre y las células progenitoras de otros tipos celulares en las biopsias de tejido basándose en sus características físicas tales como la densidad y la velocidad de sedimentación, es técnicamente muy difícil. Las limitaciones de la separación de células madre y células progenitoras de otros tipos celulares se superaron mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a las proteínas de la superficie celular tales como las proteínas del agrupamiento de diferenciación (CD). Las técnicas de inmunoadsorción y la citometría de flujo que utilizan dichos anticuerpos marcados con perlas magnéticas o moléculas fluorescentes se emplean actualmente en la selección positiva y negativa de tipos celulares específicos de entre poblaciones celulares heterogéneas.

40 En las técnicas de selección positiva, se utilizan anticuerpos marcados para unirse específicamente a las células deseadas de la biopsia. Las células no deseadas se mantienen sin marcar y se retiran. Después del procedimiento de selección las células deseadas se tienen que separar de los anticuerpos con un disolvente adecuado. En consecuencia, las células madre del trasplante se exponen a un medio que puede influenciar de manera negativa la diferenciación celular y por lo tanto la eficacia del trasplante.

45 Actualmente la mayoría de los trasplantes de células madre que se utilizan en estudios con animales y seres humanos que se orientan a mejorar los tejidos neural y vascular se han producido por selección positiva de las células que tienen proteínas de superficie específicas, seguido por el cultivo de las células seleccionadas para aumentar su

número. Sin embargo, nunca se ha probado que las células seleccionadas positivamente tengan la capacidad de diferenciarse en neuronas funcionales y que secreten los factores tróficos necesarios para la recuperación completa del sistema neural.

5 En general, los resultados de los trasplantes intratecal o intracerebral de células madre utilizando los trasplantes de células madre obtenidos por selección positiva fluctúan y los efectos beneficiosos son limitados. Esto se debe más probablemente al hecho de que no se conoce si están presentes los tipos de células madre beneficiosos deseados en las preparaciones del trasplante, o si los tipos de células madre deseados perdieron su capacidad terapéutica durante el periodo del procedimiento de procesamiento/cultivo de las células madre que en general supera las 72 horas después de la recolección de las biopsias de médula ósea.

10 En la selección celular negativa, se utilizan anticuerpos marcados para unirse específicamente a las células no deseadas de la biopsia. Las células deseadas se mantienen sin marcar y se recolectan.

15 Moviglia y colegas (Moviglia G.A. y col., *Cytotherapy* 8: 196-201, 2006) sugeían un coctel de anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD19, anti-CD38, anti-CD66b y anti-glicoforina A para enriquecer selectivamente las células madre mesenquimáticas, así como anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD56, y anti-glicoforina A para enriquecer las células positivas a CD3 mediante inmuno-rosetado para experimentos *in vitro*.

La solicitud de patente US2002058289 describe el tratamiento de las suspensiones de células derivadas de médula ósea con un intervalo de anticuerpos específicos para CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD33, CD38, CD56, CD66b y Glicoforina A para enriquecer específicamente las biopsias de médula ósea en progenitores mesenquimáticos.

20 La solicitud de patente WO02089726 describe un procedimiento para producir una preparación homogénea de células madre hematopoyéticas utilizando una combinación de elutriación de flujo cruzado y marcado de células no deseadas con anticuerpos marcados magnéticamente. El procedimiento utiliza el cultivo de las poblaciones celulares enriquecidas resultantes y colorantes de membrana celular para verificar la identidad celular, lo que hace que el procedimiento sea impracticable para aplicaciones terapéuticas.

25 La patente US5087570 describe un procedimiento de preparación de una composición de células hematopoyéticas utilizando una combinación de selección celular positiva y negativa. El procedimiento se basa en el uso de un anticuerpo contra el antígeno Sca-1 que se asocia con precursores de timocitos y la progenie de linfocitos T de médula ósea clonogénica murina. El anticuerpo Sca-1 no es útil para el aislamiento de células hematopoyéticas humanas.

30 La patente US5137809 describe un procedimiento y un kit para la identificación y análisis de linajes y estadios de maduración de células hematopoyéticas. El procedimiento utiliza un primer anticuerpo monoclonal (CD45) marcado con un fluorocromo para que reaccione con todos los leucocitos de la muestra, seguido por anticuerpos monoclonales secundarios (CD15, CD16, CD10, CD34, CD20, CD19, CD14, CD3, CD 11b) marcados con un segundo fluorocromo para que reaccionen con una subpoblación de leucocitos. La selección celular se basa en citometría de flujo.

35 Los trasplantes de células madre basados en selección celular negativa, en los que los tipos celulares del sistema inmunitario innato y adaptativo (macrófagos, linfocitos, granulocitos y similares) y las células eritroides (eritroblastos, eritrocitos) se han retirado, se han utilizado en estudios de trasplante autólogo en animales y en seres humanos. Los estudios que utilizan dichos trasplantes demostraron que la eficacia beneficiosa sigue siendo limitada, evitando su aplicación clínica posterior.

40 Utilizando un modelo de ratón de lesión de médula espinal, los inventores confirmaron que los trasplantes de células madre en los que se retiran los tipos celulares del sistema inmunitario y las células eritroides mediante selección celular negativa tienen una eficacia limitada cuando se trasplantan por vía intratecal.

Esto es debido a la presencia de tipos celulares o componentes con capacidad proinflamatoria en los trasplantes de células madre dando como resultado un efecto negativo en su eficacia terapéutica.

45 Por estas razones existe una necesidad no satisfecha de trasplantes de células madre que carezcan de capacidad proinflamatoria cuando se trasplantan a un receptor alógeno o autólogo y que como resultado mejore la eficacia de las terapias de trasplante de células madre.

Sumario de la invención

50 Los objetos anteriores se han cumplido con la presente invención en la que se proporciona un procedimiento para la producción de un trasplante de células madre, por ejemplo, de una muestra de tejido tal como una biopsia, con una actividad inflamatoria reducida. Este procedimiento comprende una etapa de suspensión de las células madre en plasma que se ha empobrecido en proteínas proinflamatorias tales como el fibrinógeno y la proteína C reactiva.

Preferentemente, el procedimiento proporciona una etapa adicional de retirada de las células proinflamatorias del trasplante de células madre. Las células madre se obtienen preferentemente de la médula ósea, sangre periférica, y/o

sangre del cordón umbilical.

5 También se proporciona en el presente documento una composición de células madre para su uso como un trasplante con una actividad inflamatoria reducida. en el que se han retirado las proteínas proinflamatorias. La descripción también proporciona una composición de células madre para su uso como un trasplante en la que también se han retirado las células con capacidad proinflamatoria. La composición de células madre como se describe en el presente documento es adecuada para la regeneración del tejido neuronal y vascular y para la recuperación de la hematogénesis.

10 Adicionalmente se proporciona en el presente documento un procedimiento para la recuperación o mejora del tejido neuronal, vascular y hematopoyético en un sujeto mediante el tratamiento del sujeto con un trasplante que comprende una composición de células madre como se describe en el presente documento. En dicho procedimiento el trasplante de células madre es un trasplante autólogo o alogéno.

15 La presente descripción proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la eficacia de la terapia de trasplantes de células madre reduciendo la actividad inflamatoria de un trasplante que comprende una composición de células madre. De manera más particular, la descripción proporciona un procedimiento de preparación de un trasplante de células madre con actividad inflamatoria reducida que comprende una etapa de suspensión de una composición que comprende células madre en un plasma empobrecido en fibrinógeno y/o en un plasma empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva.

Descripción detallada de la invención

20 Utilizando modelos animales de lesión de médula espinal, los inventores descubrieron sorprendentemente que ciertas proteínas presentes en el plasma de la médula ósea tenían un efecto negativo sobre la eficacia de las células madre obtenidas de la médula ósea, en particular cuando se utilizan como un trasplante de células madre y se trasplantan por vía intratecal en el animal autólogo.

25 Este efecto negativo parece que está causado por la presencia de las proteínas de fase aguda fibrinógeno y proteína C reactiva en el plasma de médula ósea. La retirada de las dos proteínas por filtración seguida opcionalmente por la retirada de las células con una capacidad proinflamatoria, resultaba en trasplantes de células madre con una mejora significativa de la eficacia del trasplante, en comparación con el efecto obtenido cuando se utilizaba un trasplante de células madre en las que solo se retiraban las células con capacidad proinflamatoria.

30 Se concluyó a partir de este resultado sorprendente que el uso de trasplantes de células madre en los que se retiraron las células proinflamatorias (tales como macrófagos, células dendríticas, linfocitos y granulocitos) y las proteínas de fase aguda (tal como fibrinógeno y proteína C reactiva), son superiores en términos de eficacia del trasplante en comparación con los trasplantes de células madre de la técnica anterior.

La descripción también proporciona un procedimiento para mejorar la eficacia de un trasplante de células madre, en el que los trasplantes de células madre se empobrece en fibrinógeno y proteína C reactiva. Opcionalmente, el trasplante también se ha empobrecido en células proinflamatorias.

35 La expresión "eficacia mejorada de un trasplante" se refiere a la capacidad de un trasplante, en particular un trasplante de células madre, para reparar el tejido dañado, en particular el tejido neuronal.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "trasplante de células madre" se refiere a una composición que comprende células madre en el que la composición es adecuada para la administración mediante trasplante en un sujeto.

40 El trasplante de células madre como se describe en el presente documento puede obtenerse ventajosamente a partir de una biopsia de tejido, tal como sangre periférica, sangre del cordón umbilical o médula ósea. La recolección de médula ósea o sangre periférica para su uso en terapias de trasplante de células madre autólogo o alogénico es una práctica común y los procedimientos para recolectar biopsias de médula ósea o sangre periférica se conocen bien en la técnica.

45 El término intratecal como se utiliza en el presente documento es un adjetivo que se refiere a algo introducido en o que tiene su origen en el espacio bajo la membrana aracnoidea y el cerebro o la médula espinal.

La expresión "capacidad proinflamatoria" o similar es la capacidad de las células u otros componentes para iniciar el proceso de inflamación *in vivo*, caracterizada por la acumulación de citocinas proinflamatorias. El experto es bien consciente de las opciones para determinar la capacidad proinflamatoria de un compuesto.

50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión actividad inflamatoria reducida se tiene que interpretar como la actividad inflamatoria de una composición en comparación con una composición de referencia. Una composición de referencia adecuada con respecto a una composición que comprende células madre en un plasma empobrecido en fibrinógeno y/o proteína C reactiva sería una composición que comprende las células madre resuspendidas en un plasma normal o un plasma que no se ha empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva.

Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* como se describe en la reivindicación 1.

El término plasma se utiliza en el presente documento para referirse al componente líquido amarillo pálido que normalmente sostiene las células de la sangre en la sangre completa en suspensión. Este constituye aproximadamente el 55 % del volumen sanguíneo total del cuerpo. Es la parte de fluido intravascular o fluido extracelular (todo el fluido corporal fuera de las células). Consiste principalmente en agua (hasta un 95 % por volumen), y contiene proteínas disueltas (un 6-8 %) (es decir, seroalbúminas, globulinas, y fibrinógeno), glucosa, factores de coagulación, electrolitos (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , etc.), hormonas, y dióxido de carbono (siendo el plasma el medio principal para el transporte de productos de excreción). El suero es el plasma sin los factores de coagulación. Los términos suero y plasma se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, es decir, donde se lea suero, también se refiere a plasma y viceversa.

La actividad inflamatoria de una composición se puede determinar por ensayos de rutina disponibles para el experto, tal como por procedimientos inmunológicos e histoquímicos. La actividad inflamatoria también se puede medir por procedimientos inmunoquímicos en muestras tomadas del sitio del trasplante, en el que se evalúa la presencia de marcadores inflamatorios tales como las citocinas, interleucina 1 e interferón gamma.

La composición que se describe en el presente documento tiene una actividad inflamatoria que es menor que la actividad inflamatoria de una composición que comprende las mismas células en un plasma o suero que no se ha empobrecido en fibrinógeno y/o proteína C reactiva. Menos a este respecto significa al menos un 10 % menos, tal como un 20 %, un 30 % o un 50 % menos. Preferentemente la actividad inflamatoria de una composición como se describe en el presente documento es menor del 40 % de la composición de referencia, tal como un 30 %, un 20 % o un 10 % o menos. Es más preferida una actividad inflamatoria cercana a cero o no detectable.

La descripción también proporciona un procedimiento para la reducción de la actividad inflamatoria de un trasplante de células madre que comprende una etapa de retirada del fibrinógeno y la proteína C reactiva del trasplante. Una composición que comprende células madre para su uso en un trasplante se puede obtener también resuspendiendo las células madre en suero o plasma empobrecido en fibrinógeno y/o proteína C reactiva.

Los que se puede conseguir eficazmente utilizando una etapa de filtración. Por lo tanto, la divulgación proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el fibrinógeno y proteína C reactiva se retiran mediante filtración. También, se pueden retirar el fibrinógeno y la proteína C reactiva por centrifugación en gradiente de densidad. Además, se pueden retirar el fibrinógeno y la proteína C reactiva por cromatografía.

El procedimiento que se describe en el presente documento es particularmente útil cuando el trasplante de células madre también se ha empobrecido en células proinflamatorias. La descripción también proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente una etapa de retirada de las células con capacidad proinflamatoria, tales como los macrófagos, células dendríticas, linfocitos y granulocitos.

Las células se pueden retirar por selección celular negativo o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica per se. Las diferentes etapas del procedimiento se pueden llevar a cabo en un orden aleatorio.

La selección celular negativa puede implicar una etapa de hacer reaccionar un trasplante de células madre que contiene múltiples linajes celulares con una composición de anticuerpos que contiene anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos CD235a (glicoforina A), CD2 y/o CD3, CD14 y/o CD16 y CD19 y/o CD 20 para el vaciado selectivo de las células diana eritrocitos, linfocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos. La composición de anticuerpos que se añade incluye el medio de suspensión de los anticuerpos, que consiste principalmente en una solución salina tampón para cada anticuerpo.

Los anticuerpos de la composición de anticuerpos pueden estar marcados magnéticamente, de manera que las células diana presentes en el trasplante de células madre se pueden marcar selectivamente y retirarse por retención con la aplicación de una fuerza magnética en la muestra.

Se proporciona en el presente documento un procedimiento para el empobrecimiento selectivo de linajes celulares definidos por reconocimiento mediado por anticuerpos de epítomos específicos, preferentemente, pero sin limitarse a eritrocitos, linfocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos de los trasplantes de células madre obtenidos del cuerpo humano, preferentemente, pero sin limitarse a médula ósea humana.

Preferentemente, se hace reaccionar un trasplante de células madre con una composición de anticuerpos que contiene anticuerpos capaces de unirse a los antígenos CD3, CD14, CD19 y CD235a. Los anticuerpos pueden estar marcados magnéticamente, de manera que las células diana se pueden marcar selectivamente y retirarse por retención con la aplicación de una fuerza magnética en la muestra.

Como se describe en el presente documento, las poblaciones celulares no deseadas se retiran de un volumen completo de un trasplante de células madre mediante la aplicación de anticuerpos específicos marcados magnéticamente. Preferentemente, los anticuerpos comprenden, pero no se limitan a anticuerpos específicos para CD2 y/o CD3 para retirar los linfocitos T, anticuerpos específicos para CD19 y/o CD20 para retirar los linfocitos B,

CD14 y/o CD16 para la retirada de granulocitos, monocitos, células dendríticas y macrófagos. En otro procedimiento como se ha descrito en el presente documento los anticuerpos son específicos de CD235a y/o Glicoforina A para retirar los eritrocitos.

5 La descripción también proporciona un trasplante de células madre en un procedimiento como se ha descrito anteriormente. Estos procedimientos dan lugar a un trasplante de células madre en el que se ha retirado el fibrinógeno y la proteína C reactiva. La descripción en particular describe un trasplante de células madre como se ha descrito anteriormente, en el que se han retirado las células con capacidad proinflamatoria.

10 Los términos "retirada", "vaciado", "retirado", "empobrecido" o similares se refiere a una reducción de la cantidad de proteína o número de células en el trasplante de células madre como se describe en el presente documento de al menos un 90 por ciento o 99 por ciento en comparación con la cantidad de proteína o número de células en la biopsia de tejido tal como de médula ósea. La concentración de fibrinógeno en el plasma sanguíneo varía entre 1,5 a 4 gramos por litro. Preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 0,4 gramos de fibrinógeno por litro. Una preparación de plasma adecuada para su uso en un procedimiento descrito en el presente documento contiene menos de 40 miligramos de fibrinógeno por litro, tal como menos de 4 miligramos por litro.

15 Preferentemente, una composición que comprende células madre para su uso como se describe en el presente documento comprende menos de 0,4 gramos de fibrinógeno por litro, tal como menos de 40 miligramos o menos de 4 miligramos por litro.

20 La concentración de proteína C reactiva en el plasma sanguíneo varía considerablemente entre los individuos, pero en general varía entre 10 a 100 miligramos por litro. Los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 10 miligramos de proteína C reactiva por litro. Preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 1 miligramos de proteína C reactiva por litro.

25 El número de linfocitos en el plasma sanguíneo varía entre 1 a 4 mil por microlitro. Preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 400 linfocitos por microlitro. Más preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 40 linfocitos por microlitro. El número de granulocitos en el plasma sanguíneo varía entre 2,5 a 7,5 mil por microlitro. Preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 750 granulocitos por microlitro. Más preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 75 granulocitos por microlitro. El número de células dendríticas y macrófagos en el plasma sanguíneo varía entre 10 a 800 mil por microlitro. Preferentemente, al final los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 80 células dendríticas o macrófagos por microlitro.

30 Más preferentemente, los trasplantes descritos en el presente documento contienen menos de 8 células dendríticas o macrófagos por microlitro.

35 Preferentemente, se proporciona un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el trasplante de células madre es adecuado para la regeneración del tejido hematopoyético. Dicho trasplante de células madre es particularmente adecuado para la recuperación de la hematogénesis. Por lo tanto, la descripción también proporciona un procedimiento para la recuperación de la hematogénesis en un sujeto con un trasplante de células madre como se describe en el presente documento.

40 Preferentemente, la descripción se refiere a un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el trasplante de células madre es adecuado para la regeneración del tejido vascular. Dicho trasplante de células madre es particularmente adecuado para la vascularización. Por lo tanto, la descripción también proporciona un procedimiento para la recuperación de la vascularización en un sujeto con un trasplante de células madre como se describe en el presente documento.

45 Es particularmente preferido un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el que el trasplante de células madre es adecuado para la regeneración del tejido neural. Dicho trasplante de células madre es particularmente adecuado para la neurogénesis. Por lo tanto, la descripción también proporciona un procedimiento para la recuperación o mejora de la neurogénesis en un sujeto tratando al sujeto con un trasplante de células madre como se describe en el presente documento.

Los receptores de los trasplantes de células madre como se describe en el presente documento pueden ser autólogos o alogenos. Preferentemente, el trasplante celular como se describe en el presente documento es un trasplante autólogo. También se describe en el presente documento un trasplante de células madre que es un trasplante alogeno.

50 La presente invención contempla ampliamente un procedimiento para el enriquecimiento y recuperación de células madre y progenitoras humanas para el tratamiento terapéutico de diferentes indicaciones preferentemente haciendo una composición a medida adecuada para inyección, que comprende una composición celular derivada de la sangre, sangre del cordón umbilical o médula ósea. El experto es bien consciente de los límites de dicha composición o procedimiento con respecto al volumen de producto y contenido celular cualitativo y cuantitativo.

55 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Preparación de un trasplante de células madre humanas.

5 Se recolectó médula ósea de un voluntario sano por aspiración utilizando una jeringa con una aguja de médula ósea de 5 agujeros con 2 punciones óseas. La aguja se reposicionó después de llenar cada jeringa. En total, se obtuvo una biopsia de 50 ml de médula ósea. La biopsia se centrifugó en un separador celular Spax II (Biosafe) utilizando una fuerza de centrifugación baja (a baja velocidad) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. De esta manera, se obtuvieron tres fracciones. Primero la fracción de plasma, que contenía todas las proteínas solubles de la biopsia. En segundo lugar, se obtuvo una fracción que contenía los eritrocitos y trombocitos. La tercera fracción era una composición que comprendía las células nucleadas de la médula ósea (a lo que se hace referencia a menudo como la "capa leucocitaria"), que incluye las células madre hematopoyéticas y mesenquimáticas. De aquí en adelante se hace referencia a esta como composición de células madre A.

10 La fracción de plasma se empobreció en fibrinógeno y proteína C reactiva mediante filtración utilizando un filtro específico de fibrinógeno Therasorb (Miltenyi). El plasma resultante, en el que se habían retirado el fibrinógeno y la proteína C reactiva, se utilizó posteriormente para resuspender las células nucleadas de la médula ósea de la tercera fracción (composición de células madre A) en una bolsa de preparación celular ((Miltenyi). De esta manera, se obtuvo una composición de células madre a la que se hace referencia adicionalmente en el presente documento como composición de células madre B.

15 La composición de células madre B se puso en contacto con anticuerpos marcados magnéticamente contra CD3, CD14, CD19 y CD235a ((Miltenyi). La bolsa se conectó posteriormente a un dispositivo de separación celular magnético (CliniMACS plus System, Miltenyi) con el fin de producir una composición de células madre empobrecida en eritrocitos, trombocitos, linfocitos, granulocitos, células dendríticas, macrófagos, fibrinógeno y proteína C reactiva. Se hace referencia de aquí en adelante a esta composición de células madre como composición de células madre C.

20 La composición de células madre D consistía en la preparación de células madre A resuspendida en la fracción de plasma del mismo sujeto, no empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva. Esta composición actuaba como una composición de referencia.

Ejemplo 2: Experimento de trasplante alogénico

25 Los inventores utilizaron un modelo animal experimental de lesión de médula espinal para comparar la eficacia de las distintas composiciones que comprendían las células madre. El modelo animal era una rata deficiente en linfocitos T. Las lesiones traumáticas por compresión de la médula espinal se indujeron por dilatación de globo. Tres días después, se administraron por vía intratecal las composiciones de células madre en estrecha proximidad a la lesión de la médula espinal del animal. Los animales se monitorizaron durante treinta y cinco días. En este periodo se midió el peso corporal y se sometió a los animales a ensayos de catwalk y rotarod (Pantab) para la valoración del daño neurológico. Después de 35 días los animales se sacrificaron y se examinaron histológicamente las lesiones de la médula espinal.

30 En esta configuración experimental, los animales recibieron trasplantes de células madre que comprendían las composiciones de células madre A, B, C y D, con plasma normal y animales sin tratar como controles. Se valoró cómo eran capaces las cuatro composiciones de reparar el daño neurológico después de la inducción de lesiones traumáticas de la médula espinal.

35 Después de los 35 días, se observó que el grado de mejora neurológica de los animales lesionados tratados con un trasplante de células madre como se describe en el presente documento (composiciones de células madre B y C) era significativamente mayor que la de los animales sin tratar o los tratados con plasma, o composiciones de células madre A y D. Además, la mejora neurológica de los animales tratados con la composición de células madre C era significativamente mayor que la de los animales tratados con la composición de células madre B.

Tabla 1

Condiciones experimentales	Composición de células madre (*)				Control negativo (plasma)	Control negativo (rata lesionada)	Control positivo (rata normal)
	A	B	C	D			
Catwalk	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Rotarod	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Peso corporal	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Hallazgos histológicos	+/-	+	++	+/-	-	-	+++

La actuación o estado de las ratas lesionadas se ha puesto en el 0 por ciento (línea basal) y las ratas normales en el 100 por ciento.

45 - = igual o empeoramiento de la actuación o estado (-15 a 5 por ciento en comparación con la línea basal).
 +/- = actuación o estado aproximadamente igual o ligeramente mejor (entre un -15 % a 10 % en comparación con la línea basal)
 + = ligera mejora de la actuación o estado (5 a 10 por ciento en comparación con la línea basal)

++ = gran mejora de la actuación o estado (10 a 40 por ciento en comparación con la línea basal)
 +++ = Actuación o estado normal de las ratas sin tratar (90 a 100 por ciento en comparación con la línea basal)

Ejemplo 3: Preparación de un trasplante de células madre de rata

5 Se prepararon las composiciones de células madre E, F, G y H a partir de ratas Wistar normales de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 1 para sus equivalentes humanas. La muestra E contenía las células de médula ósea nucleadas sin plasma, la muestra F era las células de médula ósea nucleadas en plasma empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva y la muestra G es la composición F empobrecida adicionalmente de eritrocitos, trombocitos, linfocitos, granulocitos, células dendríticas y macrófagos. La muestra H es una muestra de control que se corresponde con la muestra D humana en la que las células de la muestra E se resuspendieron en plasma de rata normal que
 10 comprendía fibrinógeno y proteína C reactiva.

Ejemplo 4: Experimento de trasplante autólogo.

15 Los inventores utilizaron esencialmente la misma configuración experimental que se describe en el Ejemplo 2 para comparar la eficacia de las distintas composiciones que comprenden las células madre de rata obtenidas en el Ejemplo 3. El modelo animal era una rata Wistar inmunocompetente normal. Las lesiones traumáticas por compresión de la médula espinal se indujeron por dilatación de globo. Tres días después, se administraron por vía intratecal las composiciones de células madre en estrecha proximidad a la lesión de la médula espinal del animal. Los animales se monitorizaron durante treinta y cinco días. En este periodo se midió el peso corporal y se sometió a los animales a ensayos de catwalk y rotarod (Pantab) para la valoración del daño neurológico. Después de 35 días los animales se sacrificaron y se examinaron histológicamente las lesiones de la médula espinal.

20 En esta configuración experimental, los animales recibieron trasplantes de células madre que comprendían las composiciones de células madre E, F, G y H con plasma normal y animales sin tratar como controles. Se valoró cómo eran capaces las cuatro composiciones de reparar el daño neurológico después de la inducción de lesiones traumáticas de la médula espinal.

25 Después de los 35 días, se observó que el grado de mejora neurológica de los animales lesionados tratados con un trasplante de células madre como se describe en el presente documento (composiciones de células madre F y G) era significativamente mayor que la de los animales sin tratar o los tratados con plasma, o las composiciones de células madre E y H. Además, la mejora neurológica de los animales tratados con la composición de células madre G era significativamente mayor que la de los animales tratados con la composición de células madre F.

30 Tres días después del trasplante, se obtuvo el fluido intratecal de la lesión y se ensayó en cuanto a la presencia de un marcador inflamatorio, por ejemplo, interferón gamma utilizando un kit ELIS de IFN gamma de rata (Pierce protein biology products). Se descubrió que los niveles de interferón gamma eran altos del fluido intratecal de los animales que recibieron las composiciones de células madre E y H. Los niveles de interferón gamma del fluido intratecal de los animales que recibieron las composiciones de células madre F y G eran considerablemente menores, un 30 % y un 10 %, respectivamente del nivel de los animales que recibieron la composición de células madre H.

Tabla 1

Condiciones experimentales	Composición de células madre (*)				Control negativo (plasma)	Control negativo (rata lesionada)	Control positivo (rata normal)
	E	F	G	H			
Catwalk	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Rotarod	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Peso corporal	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Hallazgos histológicos	+/-	+	++	+/-	-	-	+++

La actuación o estado de las ratas lesionadas se ha puesto en el 0 por ciento (línea basal) y las ratas normales en el 100 por ciento.

- = igual o empeoramiento de la actuación o estado (-15 a 5 por ciento en comparación con la línea basal).

40 +/- = actuación o estado aproximadamente igual o ligeramente mejor (entre un -15 % a 10 % en comparación con la línea basal)

+ = ligera mejora de la actuación o estado (5 a 10 por ciento en comparación con la línea basal)

++ = gran mejora de la actuación o estado (10 a 40 por ciento en comparación con la línea basal)

+++ = Actuación o estado normal de las ratas sin tratar (90 a 100 por ciento en comparación con la línea basal)

45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *In vitro* de producción de una composición de células madre hematopoyéticas con una actividad inflamatoria reducida que comprende:
- 5 a) proporcionar una composición de células nucleadas que comprenden al menos una célula madre,
b) suspender las células nucleadas en plasma o suero empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva,
- obteniendo de esta manera una composición de células madre con actividad inflamatoria reducida en comparación con una composición en la que las células nucleadas se suspenden en plasma normal que contenga fibrinógeno y proteína C reactiva.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la composición que comprende células nucleadas se obtiene a partir de una muestra de tejido tomada de un sujeto.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el sujeto es un sujeto humano.
4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3 en el que el plasma o suero empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva se obtiene a partir del mismo sujeto que el sujeto del que se obtiene la muestra de tejido.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, que comprende adicionalmente una etapa de empobrecimiento de células proinflamatorias de la composición que comprende las células nucleadas.
6. Un procedimiento de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el plasma o suero empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva se obtiene por filtración y/o cromatografía.
7. Un procedimiento de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 2 - 6, en el que el tejido se selecciona de entre el grupo que consiste en médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical.
- 20 8. Una composición que comprende células madre hematopoyéticas y plasma o suero empobrecido en fibrinógeno y proteína C reactiva.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 empobrecida adicionalmente de células proinflamatorias.
10. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 que comprende una célula madre hematopoyética humana.
- 25 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 para su uso como un medicamento.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 para su uso en terapia de regeneración del tejido neural.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la terapia de regeneración del tejido neural es una terapia para lesiones de la médula espinal.