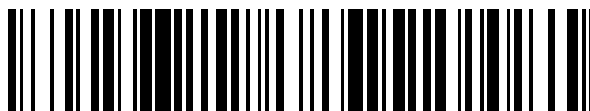


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 030**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/33 (2015.01)
A61K 35/34 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2016** **PCT/FR2016/051630**
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017** **WO17001783**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2016** **E 16744446 (2)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** **EP 3316895**

54 Título: **Procedimiento de crioconservación de células con objetivo terapéutico**

30 Prioridad:

30.06.2015 FR 1556169

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2020

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
ZA de Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques
91940 Les Ulis , FR**

72 Inventor/es:

DE LARICHAUDY, JOFFREY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 763 030 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 crioconservación de células con objetivo terapéutico

5 La presente invención se refiere a una composición de crioconservación que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

a) seroalbúmina humana,

10 b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos,

c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, y

15 d) células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor.

La presente invención se refiere a un procedimiento de crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor, que comprende las etapas siguientes:

20 i) mezcla de la muestra de células con objetivo terapéutico con:

a) seroalbúmina humana,

b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y

25 c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, después

ii) congelación de la mezcla obtenida en la etapa i),

30 obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracciones de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

35 La crioconservación es un proceso en el que se almacenan muestras biológicas a baja temperatura. La crioconservación de material biológico se efectúa generalmente por la congelación de dicho material, en un soporte apropiado, tal como un tubo o una ampolla de vidrio o de plástico (generalmente denominado "vial" o tubo de congelación en el campo de la crioconservación), siendo dicho soporte adecuado para el almacenamiento a largo plazo y a baja temperatura.

40 La crioconservación plantea no obstante un cierto número de problemas y de obligaciones técnicas. Especialmente, pueden producirse lesiones celulares durante la descongelación, lo que provoca la apoptosis o el estallido de las células. Además, la supervivencia de las células crioconservadas puede depender de las condiciones y de las técnicas empleadas durante la congelación. El control de la velocidad de enfriamiento es importante: un enfriamiento a baja velocidad permite una cristalización ordenada del agua congelable en el exterior de las células – las células se deshidratan, se encogen y el agua sale de la célula. En el caso contrario, la formación de hielo intracelular provoca la destrucción de las estructuras membranas, que es letal para la célula.

50 Para la mayoría de las células de mamíferos, como es el caso de los productos y medicamentos de terapia celular, ya sea que las células se modifiquen genéticamente o no, es además indispensable utilizar unos crioprotectores para preservar la integridad y la funcionalidad celular.

55 Actualmente, la fabricación a escala industrial (europea o mundial especialmente) de productos de terapia celular plantea nuevas problemáticas, tales como la estabilidad del producto final administrado y la variabilidad relacionada con la materia biológica de partida.

En la mayoría de los casos, el producto terminado se envasa:

60 - fresco en un medio líquido (tipo albúmina o solución salina) con una conservación limitada de algunas horas o días, o bien

65 - congelado en una formulación simple a base de DMSO, poco estable y poco eficaz a largo plazo. La cantidad significativa de células muertas, de restos con efectos potencialmente inmunogénicos y la toxicidad para el paciente de los excipientes habitualmente utilizados tienen todas limitaciones. La mayoría de las veces, se indica un lavado de las células para retirar estos elementos tóxicos (biológicos o no): estas soluciones no son compatibles con una

distribución industrial. Además, ofrecen poca flexibilidad de administración y de almacenamiento, al contrario que las otras clases de medicamentos “clásicos”.

Existe por lo tanto la necesidad del desarrollo de un producto y/o medicamento de terapia celular que sea estable a largo plazo (es decir durante varios meses), que sea fácil de utilizar, directamente inyectable y no tóxico.

La presente invención permite responder a esta necesidad. En efecto, la composición según la invención permite obtener unos productos de terapia celular que comprenden células con objetivo terapéutico, listos para el uso (es decir listos para inyectarse sin lavado, lo que evita cualquier manipulación suplementaria que provoque una reducción de la viabilidad y una pérdida de células), estables a largo plazo, fáciles de utilizar y no tóxicos.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

- a) albúmina humana (o seroalbúmina humana),
- b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos,
- c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, y
- d) células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vivo* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición (denominada también la “salida” o el “cultivo primario”) de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, y después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

Estos linfocitos que infiltran el tumor (denominados también “TILs” por “Tumor Infiltrating Lymphocytes”) se obtienen por cultivo *in vivo* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo:

- la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis. Esta aparición se denomina también “cultivo primario” o “salida”; es la etapa durante la cual los linfocitos que infiltran el tumor, inicialmente contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, pasan al medio de cultivo y se cultivan *in vitro*, y después
- la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y finalmente
- la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

Tales TILs se denominan “linfocitos que infiltran el tumor específicos” o “linfocitos específicos que infiltran el tumor” en la presente solicitud.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor, que comprende las etapas siguientes:

i) mezcla de la muestra de células con objetivo terapéutico con:

- a) primero la seroalbúmina humana, y después
- b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, después

ii) congelación de la mezcla obtenida en la etapa i),

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracciones de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, y después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

La presente invención se refiere también a la utilización de una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

a) albúmina humana,

b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y

c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, para la crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

En la presente solicitud, los linfocitos específicos que infiltran el tumor excluidos de la composición según la invención son autólogos; corresponden a los linfocitos que infiltran el tumor contenidos en el (los) tumor(es).

Estos linfocitos que infiltran el tumor excluidos de la presente invención se obtienen por cultivo *in vivo* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo:

- la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis. Esta aparición se denomina también "cultivo primario" o "salida"; es la etapa durante la cual los linfocitos que infiltran el tumor, inicialmente contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, pasan al medio de cultivo y se cultivan *in vitro*, después

- la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y finalmente

- la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

En particular, la etapa de aparición de los TILs se puede realizar por cultivo primario de la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, especialmente por cultivo primario en un medio de cultivo selectivo sin suero de tipo X-VIVO 15® (comercializado por Cambrex Corp) suplementado en interleucina-2 (IL-2).

Después de la aparición de los TILs, estos últimos sufren una etapa de estimulación, preferentemente en un recipiente de cultivo cerrado compartimentado, especialmente en presencia al menos de células nutrientes alogénicas irradiadas no proliferantes. Por "recipiente de cultivo cerrado" se entiende un sistema que permite mantener unas células en cultivo en un medio adecuado, sin que éstas estén directamente en contacto con el entorno exterior. Finalmente, la etapa de estimulación de los TILs va seguida de una etapa de amplificación.

Preferentemente, todos los TILs están excluidos de las células con objetivo terapéutico de la presente solicitud.

La composición según la invención comprende por lo tanto, en un medio fisiológicamente aceptable:

a) albúmina humana,

b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos,

c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, y

d) células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

Preferentemente, la composición según la invención está sustancialmente libre de dimetilsulfóxido (DMSO). Por "sustancialmente libre" se entiende que la composición contiene menos del 3% en peso de DMSO, preferentemente menos del 1% en peso. Preferentemente, la composición según la invención está totalmente desprovista de DMSO.

Por "medio fisiológicamente aceptable" se entiende un medio acuoso que comprende unos electrolitos. Los electrolitos son, por ejemplo, unas sales de sodio, de potasio, de magnesio y/o de calcio con unos aniones de tipo cloruro, carbonato, hidróxido o caprilato. Preferentemente, el medio fisiológicamente aceptable es un medio acuoso que comprende cloruro de sodio y caprilato de sodio.

La composición según la invención comprende la seroalbúmina humana (o albúmina humana, compuesto a)). Esta proteína es una proteína plasmática de alto peso molecular (aproximadamente 65 kDa). Es la proteína más abundante del plasma; su concentración media normal es de 38 a 48 g/l. Permite tamponar el pH y mantener la osmolaridad. Su pureza es preferentemente del 95%. Se puede utilizar también uno o varios fragmentos y/o derivados de seroalbúmina humana, siendo dichos fragmentos o derivados no inmunógenos y teniendo una propiedad oncótica similar a la seroalbúmina humana.

Preferentemente, la seroalbúmina humana, sus fragmentos y/o derivados, está presente en una cantidad comprendida entre el 2 y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición, preferentemente entre el 2,5 y el 6% en peso, preferentemente entre el 3,5 y el 4,5% en peso.

En la presente solicitud, salvo que se mencione lo contrario, las cantidades se mencionan en peso con respecto al peso total de la composición.

La composición según la invención comprende también al menos un sacárido (compuesto b)). El sacárido mejora la supervivencia y la función de las células preservando el equilibrio osmótico. Una fracción penetra las células y permite estabilizar las estructuras membranas. El sacárido se selecciona entre los disacáridos y los trisacáridos.

El disacárido tiene preferentemente por fórmula A-B, en la que A y B se seleccionan cada uno independientemente entre la glucosa, la fructosa y la manosa. El sacárido es preferentemente un disacárido. El disacárido es preferentemente un dímero de glucosa. Más preferiblemente, el disacárido se selecciona entre la trehalosa y la sacarosa. Más preferiblemente, el disacárido es la trehalosa.

Los trisacáridos se seleccionan preferentemente entre la rafinosa (trímero de galactosa, glucosa y fructosa), la maltotriosa y la isomaltotriosa (trímeros de glucosa).

El sacárido está preferentemente presente en la composición según la invención en una concentración comprendida entre 0,05 M y 1 M, preferentemente entre 0,07 M y 0,5 M, preferentemente entre 0,08 M y 0,12 M.

La composición según la invención comprende finalmente al menos una coenzima Q10 o de L-cisteína, y al menos un alcanodiol de C3-C5 (compuesto c)). La composición según la invención comprende así, como compuesto c), al menos una coenzima Q10 y al menos un alcanodiol de C3-C5.

La coenzima Q1, también denominada ubiquinona, es un compuesto químico que comprende un grupo quinona. Su nombre químico es 2,3-dimetoxi-5-metoxi-6-decaprenolbenzoquinona. Está preferentemente presente en la composición según la invención en una cantidad comprendida entre el 0,005 y el 1% en peso, preferentemente entre el 0,007 y el 0,5% en peso, preferentemente entre el 0,007 y el 0,1% en peso.

El alcanodiol de C3-C5 es preferentemente un alcano lineal, ramificado o cíclico, que comprende de 3 a 5 átomos de carbono, y 2 grupos hidroxilo. Preferentemente, se selecciona entre los alcanos lineales que comprenden de 3 a 5 átomos de carbono, y 2 grupos hidroxilo. Más preferiblemente, se selecciona entre el propano-1,2-diol, el pentano-1,5-diol y el butano-2,3-diol. El alcanodiol de C3-C5 es preferentemente el propano-1,2-diol (también denominado propilenglicol).

El alcanodiol de C3-C5 está preferentemente presente en la composición según la invención en una cantidad comprendida entre el 3 y el 10% en volumen, preferentemente entre el 3 y el 7% en volumen.

Preferentemente, la composición según la invención comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

a) albúmina humana, preferentemente en una cantidad comprendida entre el 2,5 y el 6% en peso,

b) un sacárido, preferentemente trehalosa, preferentemente en una concentración comprendida entre 0,07 M y 0,5 M, y

c) coenzima Q10 y propano-1,2-diol, preferentemente en una cantidad respectivamente comprendida entre el 0,007 y el 0,1% en peso, y en una cantidad comprendida entre el 3 y el 10% en volumen.

La composición según la invención es particularmente interesante, y tiene como objetivo crioconservar al menos una muestra de células con objetivo terapéutico. En efecto, los compuestos a) a c) utilizados en la composición según la invención permiten crioconservar las células con objetivo terapéutico, de manera duradera y eficaz.

Las células con objetivo terapéutico (compuesto d)) se seleccionan preferentemente entre:

- las células inmunitarias, tales como las células NK, los monocitos, los linfocitos B, los linfocitos T, naturales o genéticamente modificados, tales como los linfocitos T reguladores, los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos T auxiliares (o "helper") y los linfocitos T que tienen un receptor antigénico quimérico (CAR);

5 - los mioblastos humanos;

- las células madre hematopoyéticas;

- las células madre mesenquimatosas;

10

- las células cardíacas;

- los fibroblastos; y

15 - cualquier otra célula natural o genéticamente modificada.

Las células NK (o linfocitos NK) son unas células de la inmunidad innata. Son unos linfocitos no T (CD3-) no B (CD19-), caracterizados en el ser humano por los marcadores CD56, CD16 y NK.

20 Los monocitos son unos leucocitos que evolucionan en macrófagos, células dendríticas u osteoclastos.

Los linfocitos B son las células inmunitarias responsables de la producción de anticuerpo.

25 Los linfocitos T reguladores son una sub-población de linfocitos T CD4+, que inhiben la proliferación de otros linfocitos T efectores.

Los linfocitos T citotóxicos son una subpoblación de linfocitos T CD8+, que destruyen las células infectadas.

30 Los linfocitos T auxiliares (helper) son una subpoblación de linfocitos T CD4+, intermedios de la respuesta inmunitaria.

Finalmente, los linfocitos T que tienen un receptor antigénico quimérico (CAR), denominados también células CAR-T, corresponden a una tecnología particular de ingeniería celular. Son unos linfocitos T que expresan un receptor antigénico quimérico. Las células CAR-T son capaces de matar las células cancerosas, por reconocimiento y unión al antígeno tumoral presente en dichas células cancerosas.

35

La muestra de células con objetivo terapéutico puede provenir del paciente a tratar (en este caso el paciente y el donante son la misma persona), por biopsia o extracción sanguínea. En este caso, la composición obtenida, una vez crioconservada y después descongelada, se administrará a este mismo paciente: es un producto autólogo.

40 Alternativamente, la muestra de células con objetivo terapéutico puede provenir de otra fuente (por ejemplo otro individuo, ingeniería celular), especialmente por biopsia o extracción sanguínea. En este caso, la composición obtenida, una vez crioconservada y después descongelada, se administrará a un paciente diferente del donante: es un producto alogénico.

45 La presente invención se refiere también a un procedimiento de crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos específicos que infiltran el tumor, que comprende las etapas siguientes:

i) mezcla de la muestra de células con objetivo terapéutico con:

50

a) albúmina humana,

b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y

55 c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, y después

ii) congelación de la mezcla obtenida en la etapa i),

60 obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracciones de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

65 En este procedimiento, la etapa de mezcla i) de la muestra de células con objetivo terapéutico con los compuestos a) a c) descritos anteriormente se lleva a cabo típicamente por dilución. Preferentemente, las células se recogen en el

compuesto a) en forma líquida, preferentemente para un 50% del volumen, después se añaden los compuestos b) y c), preferentemente mezclados entre sí anteriormente para obtener una solución de concentración 2x. La mezcla de la etapa i) puede llevarse a cabo en torno a los 4°C, o a temperatura ambiente (por ejemplo 20°C).

5 Preferentemente, la muestra de células con objetivo terapéutico, por su parte, se cultiva previamente *in vitro*, en un medio de cultivo apropiado. Después sufre una centrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspende el residuo en los compuestos a), y después b) y c) descritos anteriormente.

10 La etapa de congelación (etapa ii)) se efectúa preferentemente sobre un descenso de la temperatura de +4°C o temperatura ambiente hasta una temperatura comprendida entre -100°C y -160°C.

La etapa de congelación (etapa ii)) se efectúa preferentemente hasta una temperatura comprendida entre -100°C y -180°C, preferentemente comprendida entre -140°C y 160°C.

15 La muestra se almacena después a una temperatura inferior a -130°C en general.

Preferentemente, la congelación ii) se realiza colocando la mezcla obtenida en la etapa i) en un recipiente sumergido en una mezcla de isopropilo alcohol a +4°C, poniéndose el conjunto a una temperatura comprendida entre -70°C y -100°C. Este sistema ("congelación en caja Naglène") permite, gracias al enfriamiento lento del alcohol, un descenso de la temperatura casi lineal comprendida entre -1°C y -2°C por minuto. Alternativamente, y preferentemente, la congelación ii) se efectúa con la ayuda de un congelador programado. Tales congeladores se comercializan, especialmente, por Air Liquide o Cryobiosystem.

25 Preferentemente, la congelación ii) se lleva a cabo, especialmente, con la ayuda de un congelador programado, por las etapas siguientes:

- colocar la mezcla obtenida en la etapa i) a una temperatura de +4°C; después

30 - disminuir la temperatura de 1°C por minuto, de +4°C a -40°C; después

- disminuir la temperatura de 10°C por minuto, de -40°C a -150°C, para alcanzar una temperatura final de almacenamiento de aproximadamente -150°C.

35 El producto así obtenido, congelado, se puede conservar durante algunos meses a -150°C aproximadamente. Estas temperaturas son las aplicadas a la muestra.

un descenso de la temperatura casi lineal comprendida entre -1°C y -2°C por minuto. Alternativamente, y preferentemente, la congelación ii) se efectúa con la ayuda de un congelador programado. Tales congeladores se comercializan, especialmente, por Air Liquide o Cryobiosystem.

40 Preferentemente, la congelación ii) se lleva a cabo, especialmente, con la ayuda de un congelador programado, por las etapas siguientes:

45 - colocar la mezcla obtenida en la etapa i) a una temperatura de +4°C; después

- disminuir la temperatura de 1°C por minuto, de +4°C a -40°C; después

- disminuir la temperatura de 10°C por minuto, de -40°C a -150°C, para alcanzar una temperatura final de almacenamiento de aproximadamente -150°C.

50 El producto así obtenido, congelado, se puede conservar durante algunos meses a -150°C aproximadamente. Estas temperaturas son las aplicadas a la muestra.

La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes, de ninguna manera limitativos.

55 **Ejemplo 1: Ensayo con la formulación según la invención para criopreservar unos mioblastos**

La formulación siguiente, denominada PG 5%, se ha preparado:

60 Propilenglicol 5% + coenzima Q10 0,01% + trehalosa 0,1M + seroalbúmina humana (AH) 4%.

Necesita un tiempo de incubación de 30 minutos máximo a 4°C antes de la congelación.

65 Esta formulación compleja está asociada a un ciclo de descenso de la temperatura automatizado efectuado mediante CRF (congelador programado) que permite un descenso de la temperatura compleja según un ciclo definido. Hasta -40°C, las células se consideran como sensibles: es descenso de la temperatura es lento y progresivo para permitir la

formación de cristales regulares. Por debajo de este nivel, el producto se considera como estable y el descenso de la temperatura es rápido, hasta la temperatura de almacenamiento de -150°C máximo (nitrógeno gaseoso o líquido).

Contexto del estudio

- 5 Durante el estudio de congelación de los mioblastos, se han efectuado 4 ciclos, cuyas características se presentan en la tabla siguiente:

Ciclo (nº de lote)	Materia de partida	Comentarios
1	Ampolla paso 1	Ningún control DMSO 10%
2	Ampolla paso 2	Ningún control DMSO 10%
3	Ampolla paso 2	/
4	Ampolla paso 2	/

- 10 Para estos 4 ciclos, se han descongelado unas ampollas de mioblastos procedentes de pacientes sanos. Las células se amplificaron y después se descongelaron a la concentración de 5×10^6 células/ml por CRF:

A fin de demostrar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado 3 brazos. Para cada brazo, 2 ampollas de 1 ml se han descongelado para el ensayo.

	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3
Congelación	DMSO 10%**	CS10*	PG 5%
Ampollas	1A y 1B	2A y 2B	3A y 3B

* CS10: Cryostor 10, formulación de congelación comercial (STEMCELL Technologies)

** DMSO 10% + AH 4%.

Criterio de evaluación

- 25 Con el objetivo de evaluar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado diferentes ensayos, presentados en la tabla siguiente, antes de la congelación (denominado T0) y después de la congelación. Los resultados obtenidos con las células descongeladas se compararon con T0 y se expresaron en % de T0. Este primer análisis permite pronunciarse sobre el efecto de la congelación sobre las células para cada brazo ensayado.

T0	Post descongelación	Objetivo
Viabilidad	Viabilidad a 0h pos descongelación	Criterio general (1º criterio observado frecuentemente liberatorio que permite o no la inyección correlacionada con la eficacia y con los efectos secundarios (aumento de las impurezas acelulares debidas a los restos, agregados, etc.
	Viabilidad a 4h post descongelación	
Fenotipo		Caracterización de las subpoblaciones celulares y en particular de las células de interés. En efecto, el ciclo de congelación/descongelación puede afectar específicamente a algunos subtipos más sensibles y modificar la balanza del producto inyectado (aumento de las impurezas celulares)
Ensayo de proliferación		Determinación del factor de amplificación de las células y por lo tanto de su capacidad de recogida correlacionada con su actividad metabólica/funcional

- 30 Los diferentes brazos se compararon por un análisis estadístico. La formulación de referencia (brazo 1) es el DMSO 10% + AH 4% (formulación básica muy extendida en los centros de inyección de células hematopoyéticas). Para los ciclos 1 y 2, el brazo 2 (congelación en CS10) sirvió de referencia en ausencia de brazo DMSO 10%.

Durante el análisis estadístico, la homogeneidad de las varianzas se ha analizado mediante un ensayo de Fisher (F-test, varianza homogénea si $p > 0,05$). En el caso de varianza no homogénea, se realizó un ensayo de igualdad de las expectativas con dos observaciones de varianza iguales.

- 5 En el caso de varianza no homogénea, se realizó un ensayo de igualdad de expectativas con dos observaciones de varianzas diferentes. Las medias son no significativamente diferentes si $p > 0,05$. Las medias son significativamente diferentes si $p < 0,05$.

Resultados

10 Análisis de la viabilidad de las células

El análisis de la viabilidad *post* descongelación demuestra que las condiciones ensayadas son no significativamente diferentes de T0 para todos los brazos (del 90 al 109% de T0).

- 15 Las condiciones PG 5% y CS10 son estables.

Para el lote 4, las condiciones CS10, PG 5% y DMSO 10% son no diferentes entre sí y con respecto a T0.

- 20 Para los lotes 3 y 2, las 2 formulaciones ensayadas son no diferentes de T0 y de DMSO 10%. Cabe señalar que el brazo 3 PG 5% es siempre no diferente del brazo CS10, sean cuales sean los ciclos.

Al final, se reducen las diferencias entre las diferentes formulaciones, y por lo tanto la viabilidad *post* descongelación no es un criterio discriminante.

- 25 Viabilidades a 0h post descongelación:

Lote 1:

0h post descongelación	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	96,9	95,0	95,3	94,2	92,8
% a T0		98,0%	98,3%	97,2%	95,8%
Media		98,2		96,5	
Variancia		0,04		0,98	
F-Ensayo				0,13	
T-Ensayo				0,15	

30 Lote 2:

0h post descongelación	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	95,9	93,2	96,2	94,6	95,4
% a T0		97,2%	100,3%	98,6%	99,5%
Media		98,7		99,1	
Variancia		4,50		0,32	
F-Ensayo				0,17	
T-Ensayo				0,86	

Lote 3:

0h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	95,0	90,3	91,6	95,6	96,4	92,4	95,2
% a T0		95,1%	96,4%	100,6%	101,5%	97,3%	100,2%
Media		95,7		101,1		98,7	
Variancia		0,84		0,32		3,92	
F-Ensayo				0,35		0,28	
T-Ensayo				0,02		0,21	

Lote 4:

0h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	83,1	87,7	85,3	88,1	90,5	87,7	83,5
% a T0		105,5%	102,6%	106,0%	108,9%	105,5%	100,5%
Media		104,1		107,5		103,0	
Variancia		2,88		2,88		8,82	
F-Ensayo				0,50		0,33	
T-Ensayo				0,24		0,75	

- 5 El análisis de la viabilidad de las células después de 4 horas a temperatura ambiente en su contenedor primario y su formulación de congelación permite evaluar la estabilidad descongelada de las células (simula las condiciones de manipulación, transporte y espera antes de la inyección al paciente en condiciones reales). Pone en evidencia una bajada moderada de los porcentajes de viabilidades para los 3 brazos, inferior al 20% de T0, lo cual es aceptable.
- 10 Después del análisis de las formulaciones, en el caso de PG 5%, no hay diferencia significativa con respecto a T0 y al control positivo CS10. Esto demuestra que la formulación PG 5% es más eficaz para conservar unos mioblastos después de 4 horas de descongelación.

Viabilidades a 4h post descongelación:

15

Lote 1:

4h post descongelación	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	96,9	93,4	94,6	90,4	94,7
% a T0		96,4%	97,6%	93,3%	97,7%
Media		97,0		95,5	
Variancia		0,72		9,24	
F-Ensayo				0,17	
T-Ensayo				0,58	

Lote 2:

4h post descongelación	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	95,9	96,4	95,7	95,4	95,3
% a T0		100,5%	99,8%	99,5%	99,4%
Media		100,2		99,4	
Variancia		0,25		0,01	

ES 2 763 030 T3

F-Ensayo			0,09
T-Ensayo			0,19

Lote 3:

4h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	95,0	85,8	93,9	95,0	95,7	90,9	96,0
% a T0		90,3%	98,8%	100,0%	100,7%	95,7%	101,1%
Media		94,6		100,4		98,4	
Variancia		32,81		0,25		13,01	
F-Ensayo				0,05		0,36	
T-Ensayo				0,31		0,53	

Lote 4:

4h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de viabilidad	83,1	80,9	81,5	82,5	83,9	82,4	79,3
% a T0		97,4%	98,1%	99,3%	101,0%	99,2%	95,4%
Media		97,7		100,1		97,3	
Variancia		0,18		0,98		4,81	
F-Ensayo				0,26		0,12	
T-Ensayo				0,12		0,85	

5

Análisis del fenotipo

Se ha efectuado un fenotipo a fin de determinar la estabilidad de los mioblastos en el producto. Para los 3 primeros lotes, los porcentajes encontrados son idénticos a T0 y no significativamente diferentes del brazo referente DMSO 10%. Para el lote 4, el porcentaje de mioblastos disminuye en la formulación PG 5%: la reducción observada se debe a valores muy agrupados y al número limitado de réplicas (pasa del 64,8% en el T0 al 60,7% en PG 5%).

10

Fenotipos

15

Lote 1:

	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
CD45- / CD90+ / CD56+	38,18	36,47	39,41	36,63	37,07
% a T0		95,5%	103,2%	95,9%	97,1%
Media		99,4		96,5	
Variancia		4,32		0,10	
F-Ensayo				0,09	
T-Ensayo				0,54	

Lote 2:

	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
CD45- / CD90+ / CD56+	18,17	15,09	16,08	15,24	14,96
% a T0		83,0%	88,5%	83,9%	82,3%
Media		85,8		83,1	

ES 2 763 030 T3

Variancia		0,49	0,04
F-Ensayo			0,18
T-Ensayo			0,45

Lote 3:

	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
CD45- / CD90+ / CD56+	39,69	38,66	39,81	39,69	39,56	37,6	38,2
% a T0		97,4%	100,3%	100,0%	99,7%	94,7%	96,2%
Media		98,9		99,8		95,5	
Variancia		0,66		0,01		0,18	
F-Ensayo				0,07		0,31	
T-Ensayo				0,57		0,18	

Lote 4:

	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
CD45- / CD90+ / CD56+	64,81	61,42	62,12	65,17	61,89	60,64	60,72
% T0		94,8%	95,8%	100,6%	95,5%	93,6%	93,7%
Media		95,3		98,0		93,6	
Variancia		0,24		5,38		0,00	
F-Ensayo				0,13		0,07	
T-Ensayo				0,40		0,09	

5

Análisis de la proliferación de las células

Lote 1:

	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
Cantidad células N-I	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000
Concentración	142 000	126 000	102 000	68 600	74 800
Volumen	0,35	0,275	0,275	0,275	0,275
Cantidad célula N	49 700	34 650	28 050	18 865	20 570
Factor de amplificación	3,31	2,31	1,87	1,26	1,37
% a T0		69,7%	56,4%	38,0%	41,4%
Media		63,1		39,7	
Variancia		0,10		0,01	
F-Ensayo				0,16	
T-Ensayo				0,08	

10

Lote 2:

	T0	CS10		PG 5%	
		2A	2B	3A	3B
Cantidad células N-I	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000
Concentración	583 000	218 000	163 000	154 000	135 000

ES 2 763 030 T3

Volumen	0,350	0,265	0,280	0,275	0,300
Cantidad célula N	204 050	57 770	45 640	42 350	40 500
Factor de amplificación	13,6	3,9	3,0	2,8	2,7
% a T0		28,3%	22,4%	20,8%	19,8%
Media		25,3		20,3	
Variancia		0,33		0,01	
F-Ensayo				0,10	
T-Ensayo				0,24	

Lote 3:

		DMSO 10%		CS10		PG 5%	
	T0	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Cantidad células N-I	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000
Concentración	383 000	102 000	147 000	245 000	266 000	68 500	102 000
Volumen	0,34	0,37	0,37	0,37	0,39	0,37	0,37
Cantidad célula N	130 220	37 740	54 390	90 650	103 740	25 345	37 740
Factor de amplificación	8,7	2,5	3,6	6,0	6,9	1,7	2,5
% a T0		29,0%	41,8%	69,6%	79,7%	19,5%	29,0%
Media		35,4		74,6		24,2	
Variancia		0,62		0,38		0,34	
F-Ensayo				0,42		0,41	
T-Ensayo				0,04		0,30	

Lote 4:

		DMSO 10%		CS10		PG 5%	
	T0	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Cantidad células N-I	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000	15 000
Concentración	67 900	56 000	60 900	64 300	96 100	67 100	48 000
Volumen	0,28	0,26	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24
Cantidad célula N	19 012	14 560	15 225	16 075	24 025	16 775	11520
Factor de amplificación	1,3	1,0	1,0	1,1	1,6	1,1	0,8
% a T0		76,6%	80,1%	84,6%	126,4%	88,2%	60,6%
Media		78,3		105,5		74,4	
Variancia		0,00		0,14		0,06	
F-Ensayo				0,05		0,08	
T-Ensayo				0,33		0,80	

5

Los ensayos de proliferación se realizaron con unos tiempos de incubación diferentes:

- lote 1: 3 días de proliferación.

10

- lote 2: 5 días de proliferación.

- lote 3: 5 días de proliferación.

- lote 4: 3 días de proliferación.

15

En primer lugar, el análisis de los resultados demuestra que el potencial de proliferación de las células disminuye después de la congelación en todos los casos. En efecto, los resultados de los porcentajes de T0 varían altamente. Los factores de amplificación de las células formuladas en PG 5% no son significativamente diferentes de los brazos de referencia.

Conclusión del estudio

El presente estudio de congelación se ha realizado por lo tanto sobre 4 lotes de mioblastos humanos de donantes diferentes. Entre los criterios estudiados, las conclusiones son:

- viabilidad de las células. La criopreservación de los mioblastos es eficaz en formulaciones PG 5% en términos de viabilidad celular, ya que es siempre superior al 80% de T0. La eficacia de PG 5% es muy buena. Los resultados obtenidos a 4h post descongelación son correctos y validan una utilización clínica.

- Ensayo de proliferación. La congelación de los mioblastos provoca una reducción inherente de la capacidad de proliferación de células traducida por factores de amplificación más baja que T0. Esta reducción es común a todos los brazos. Este fenómeno, habitualmente observado en laboratorio, no es un criterio de exclusión de nuestras formulaciones de congelación.

- Fenotipo. La formulación de congelación PG 5% preserva perfectamente el porcentaje de células de interés (mioblastos).

Ejemplo 2: Ensayos de la formulación según la invención para criopreservar unas células mononucleadas de la sangre (CMN)

Se ha preparado la formulación siguiente, denominada PG 5%:

Propilenglicol 5% + Coenzima Q10 0,01% + Trealoza 0,1M + seroalbúmina humana (AH) 4%.

Necesita un tiempo de incubación de 30 minutos máximo a 4°C antes de la congelación.

Esta formulación está asociada a un ciclo de reducción de la temperatura automatizada efectuada mediante un CRF (congelador programado) que permite una reducción de temperatura compleja según un ciclo definido. Hasta -40°C, las células se consideran como sensibles: la reducción de la temperatura es lenta y progresiva para permitir la formulación de cristales regulares. Por debajo de este nivel, el producto se considera como estable y la reducción de la temperatura es rápida hasta la temperatura de almacenamiento de -150°C máximo (nitrógeno gaseoso o líquido).

Contexto del estudio

Durante el estudio de congelación de CMN, se han efectuado 2 ciclos, cuyas características se presentan en la tabla siguiente:

Ciclo (nº de lote)	Materia de partida
1 (16Pi00230)	Anillo de kit de donación de citaféresis
2 (16Pi00231)	Anillo de kit de donación de citaféresis

Para estos dos ciclos, se han aislado unos CMN a partir de anillo de kit de donación de citaféresis después de ficoll. Después de una incubación de 24h en frasco, que permite la adhesión de los monocitos, los CMN se congelaron a la concentración de 20×10^6 células/ml por CRF.

Con el fin de demostrar la eficacia de las formulaciones de congelación, se realizaron 3 brazos. Para cada brazo, se descongelaron 2 ampollas de 1 ml para el ensayo.

	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3
Congelación	DMSO 10%**	CS10*	PG 5%
Ampollas	1A y 1B	2A y 2B	3A y 3B

* CS10: Cryostor 10, formulación de congelación comercial

Criterio de evaluación

Con el objetivo de evaluar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado diferentes ensayos, presentados en la tabla siguiente, antes de la congelación (denominado T0) y después de la congelación. Los resultados obtenidos con las células descongeladas se compararon al T0 y expresaron en % de T0. Este primer análisis permite pronunciarse sobre el efecto de la congelación sobre las células para cada brazo ensayado.

T0	Post descongelación	Objetivo
Viabilidad	Viabilidad post descongelación (medida en la hora)	Criterio primario que da cuenta de la eficacia de congelación, correlacionada con la presencia de impurezas (células muertas, restos, agregados) frecuentemente origen de efectos secundarios en el paciente.
	Viabilidad a 4h post descongelación	La viabilidad de las células después de 4h a temperatura ambiente en la formulación ensayada permite evaluar la estabilidad descongelada (este tiempo es necesario para la manipulación, el transporte y la inyección de las células en condiciones clínicas)
Fenotipo		Caracterización de las subpoblaciones celulares, en particular de las células de interés y de su importancia. En efecto, el ciclo de congelación/descongelación puede afectar específicamente a algunos subtipos más sensibles y modificar el equilibrio del producto inyectado (aumento de las impurezas celulares por ejemplo)
Ensayo de proliferación		Determinación del factor de amplificación de las células = capacidad de recogida correlacionada con su actividad metabólica
Ensayo de desgranulación		Ensayo funcional de determinación del potencial inmune de los linfocitos T CD8+ (síntesis de IFN γ y liberación de gránulos citotóxicos)

En una segunda fase, los diferentes brazos de congelación se han comparado por un análisis estadístico. La formulación de congelación de referencia habitualmente utilizada dentro de los laboratorios es el DMSO 10% + AH 4%, el brazo 1 sirvió de referencia para el análisis estadístico.

5 Durante el análisis estadístico, se ha analizado la homogeneidad de las varianzas mediante un ensayo de Fisher (F-Test, varianza homogénea si $p > 0,05$) y según el resultado, se realizó un ensayo de igualdad de las expectativas con dos observaciones de varianzas iguales o diferentes. Los medios son significativamente diferentes si $p < 0,05$.

10 Análisis de la viabilidad de las células

Para cada lote, el análisis de la viabilidad post descongelación demuestra que los porcentajes obtenidos para la descongelación son equivalentes a T0 para los brazos 1, 2 y 3 ($> 96,0\%$ del T0). Cabe señalar que la viabilidad de las condiciones 1 a 3 es estable con respecto a T0.

15 Para el lote 16Pi00230, los brazos 2 y 3 no presentan diferencia con el brazo 1.

20 Para el lote 16Pi00231, la condición PG 5% es significativamente superior a la condición CS10 y DMSO 10% a 0h post descongelación. En efecto, la viabilidad tiende a aumentar con respecto a T0 (un 104,2%, pudiendo las centrifugaciones haber eliminado células muertas/restos).

16Pi00230							
Post	T0	DMSO 10 %		CS10		PG 5 %	
descongelación		1A	1B	2A	2B	3A	3B
Viabilidad	93,5	91,6	93,6	92,6	93,4	92,3	92,2
% a T0		98,0%	100,1%	99,0%	99,9%	98,7%	98,6%

Media		99,0%	99,5%	98,7%			
Variancia		2,00	0,32	0,00			
F-Ensayo			0,24	0,03			
T-Ensayo			0,75	0,79			
	16Pi00231						
Post	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5 %	
descongelación		1A	IB	2A	2B	3A	3B
Viabilidad	89,4	87,2	86,6	87,1	86	93,3	92,9
% a T0		97,5%	96,9%	97,4%	96,2%	104,4%	103,9%
Media		97,2%		96,8%		104,1%	
Variancia		0,18		0,61		0,08	
F-Ensayo				0,32		0,37	
T-Ensayo				0,63		0,00	

Tabla de análisis de la viabilidad de los CMN a 0h post descongelación

El análisis de la viabilidad a 4h post descongelación pone en evidencia una reducción moderada de los porcentajes de viabilidad para los 4 brazos con respecto al T0, inferior o igual al 12%. En esta fase, la formulación PG 5% es mejor que la formulación DMSO 10%.

5

	16Pi00230						
4h post	T0	DMSO 10 %		CS10		PG 5 %	
descongelación		1A	1B	2A	2B	3A	3B
Viabilidad	93,5	84,2	84,7	88,9	86,2	88,8	86,9
% a T0		90,1%	90,6%	95,1%	92,2%	95,0%	92,9%
Media		90,3%		93,6%		94,0%	
Variancia		0,13		3,65		1,80	
F-Ensayo				0,12		0,16	
T-Ensayo				0,15		0,07	
	16Pi00231						
4h post	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5 %	
descongelación		1A	1B	2A	2B	3A	3B
Viabilidad	89,4	88,5	87,2	87,3	86,1	88,7	90,7
% a T0		99,0%	97,5%	97,7%	96,3%	99,2%	101,5%
Media		98,3%		97,0%		100,3%	
Variancia		0,84		0,72		2,00	
F-Ensayo				0,47		0,37	
T-Ensayo				0,32		0,26	

Tabla de análisis de la viabilidad de los CMN a 4h post descongelación

Análisis de la proliferación de las células por ensayo CFSE

10

Este método de inmunomarcado tiene como objetivo medir la proliferación de las células observando la extinción de un marcado intracelular, el CFSE (CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester), que se diluye por la división de la célula madre marcada en 2 células hijas. Da cuenta del estado funcional de las células.

15

Para cada uno de los lotes, el ensayo demuestra la capacidad de las células descongeladas para proliferar para todos los brazos. El análisis estadístico concluye con la ausencia de diferencia significativa entre los brazos congelados en

CS10 y PG 5% frente a DMSO 10%. Sin embargo, la formulación ensayada y el CS10 dan unos resultados más homogéneos (varianza reducida sobre los duplicados) mientras que el control DMSO 10% es muy variable (desviación estándar = 14,5% para el lote 16Pi00230).

	16Pi00230						
	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5 %	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de células proliferantes (relación entre T48h y T0h)	92,0	93,6	73,0	92,1	96,5	93,3	92,6
% a T0		101,7%	79,3%	100,0%	104,9%	101,4%	100,6%
Media		90,5%		102,5%		101,0%	
Variancia		212,18		9,68		0,25	
F-Ensayo				0,13		0,02	
T-Ensayo				0,41		0,52	
16Pi00231							
	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% de células proliferantes (relación entre T48h y T0h)	96,0	92,9	96,9	95,4	92,9	94,3	92,1
% a T0		96,9%	101,0%	99,4%	96,8%	98,2%	96,0%
Media		98,9%		98,1%		97,1%	
Variancia		8,00		3,23		2,27	
F-Ensayo				0,36		0,31	
T-Ensayo				0,77		0,53	

5 Tabla de análisis de la proliferación de los CMN post descongelación

10 Análisis del ensayo de desgranulación

El ensayo de desgranulación permite evaluar la capacidad inmune de las células (en particular la población CD8+ citotóxica efectora) en respuesta a una señal de activación CD3-CD28 imitada por unas bolas.

El porcentaje de células desgranulantes disminuye en todas las condiciones congeladas con respecto a T0.

15 Para el lote 16Pi00230, la comparación de las diferentes condiciones entre sí, no demuestra diferencia significativa ya que el referente DMSO 10% es también muy variable ($=16,2 \pm 6,7$). Entre las 2 otras condiciones ensayadas, el PG5% es la formulación que preserva mejor la funcionalidad de las células.

20 Para el lote 16Pi00231, en el caso de las condiciones 1 a 3, esta reducción es moderada y aceptable. Para los brazos 1 y 2, los porcentajes de células proliferantes son estables (aproximadamente un 20%).

	16Pi00230						
	T0	DMSO 10 %		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% CD3+ CD8+ CD107+IFN+	49,0	11,5	20,9	8,5	10,6	12,0	11,7
% a T0		23,4%	42,7%	17,3%	21,6%	24,5%	23,8%
Media		33,0%		19,4%		24,1%	
Variancia		44,94		2,21		0,05	

ES 2 763 030 T3

F-Ensayo				0,14		0,02	
T-Ensayo				0,30		0,53	
	16Pi00231						
	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
% CD3+ CD8+ CD107+IFN+	22,3	22,9	20,9	20,6	19,7	14,4	14,3
% a T0		102,9%	93,7%	92,4%	88,6%	64,8%	64,1%
Media		98,3%		90,5%		64,5%	
Variancia		2,08		0,36		0,01	
F-Ensayo				0,25		0,05	
T-Ensayo				0,26		0,02	

Tabla de análisis du test de desgranulación de los CMN post descongelación

Análisis del fenotipo

- 5 Permite determinar la composición celular de los CMN dada en porcentajes.

Entre las células totales:

- Células hematopoyéticas (CD45+)
- 10 • Impurezas celulares no hematopoyéticas (CD45-)

Entre las células CD45+:

- linfocitos T CD45+/3+
- 15 • linfocitos T citotóxico CD45+/3+/8+
- linfocitos T helper CD45+/3+/4+
- NK (Natural Killer) CD45+/3+/16+ y/o56+
- linfocitos B CD45+/19+/3-
- 20 • monocitos CD45+/14+/3-

	16Pi00230						
Tipo celular	T0	DMSO 10 %		CS 10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
CD45+	94,2	97,3	96,5	96,4	96,0	98,5	98,4
CD45-	5,8	2,7	3,5	3,6	4,0	1,5	1,6
Ly T CD3+	59,2	50,1	58,4	57,3	61,3	66,2	65,7
LyT citotóxico CD8+	15,3	15,5	13,5	14,8	15,1	15,3	15,3
LyThelperCD4+	42,7	32,8	36,2	40,7	44,6	49,8	49,1
NK CD16+ y/o CD56+	18,3	14,0	14,8	12,2	14,7	5,6	7,3
Ly B CD19+	5,1	7,9	8,5	7,5	7,3	7,8	7,7
Monocito CD45+ CD3- CD14+	3,6	4,7	5,0	5,2	4,0	3,2	5,7
	16Pi00231						
Tipo celular	T0	DMSO 10%		CS 10		PG 5 %	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
CD45+	92,8	97,3	96,7	96,3	95,3	97,4	97,1

CD45-	7,2	2,7	3,3	3,7	4,7	2,6	2,9
Ly T CD3+	68,7	66,7	67,7	67,1	68,9	69,7	69,2
LyT citotóxico CD8+	25,9	28,0	28,2	27,8	27,3	25,3	25,9
LyThelperCD4+	42,1	37,9	38,8	38,7	40,9	43,7	42,5
NK CD16+ y/o CD56+	12,4	10,8	11,4	10,9	10,2	6,7	7,2
Ly B CD19+	6,9	7,8	8,0	7,5	7,3	8,3	8,6
Monocito CD45+ CD3- CD14+	5,3	4,9	4,9	4,7	4,7	3,9	3,6

Tabla recapitulativa por lote de los resultados obtenidos para el fenotipaje de los CMN
Ly T: linfocito T. NK: Natural Killer. Ly B: linfocito B

Los resultados obtenidos para cada lote siguen la misma tendencia. En efecto, los valores de T0 son similares y permiten un análisis de las medias combinadas de los 2 lotes. La tabla siguiente presenta estos valores en % del T0 (n=2 réplicas sobre 2 lotes, es decir 4 valores en total para las condiciones descongeladas, T0 realizado en duplicado solamente).

Tabla de análisis de los fenotipos Medias expresadas en % del T0 obtenidas sobre los 2 lotes

Tipo celular	DMSO 10%	CS10	PG5%
CD45+	103,7%	102,7%	104,7%
CD45-	47,4%	61,8%	32,0%
Ly T CD3+	94,6%	99,6%	106,2%
Ly T citotóxico CD8+	101,7%	102,0%	99,6%
Ly T helper CD4+	85,9%	97,2%	109,1%
NK CD16+ y/o CD56+	84,2%	79,4%	45,8%
Ly B CD19+	138,2%	126,4%	137,3%
Monocito CD45+ CD3-CD14+	114,4%	108,6%	96,7%

La formulación PG 5% permite una mejor conservación de las células CD45+ en detrimento de las células CD45- que disminuyen en proporción. En particular, el porcentaje de linfocitos T CD8+ permanece constante y los CD4+ aumentan. Al contrario, los NK disminuyen en gran medida. El porcentaje de monocitos sigue estable. Es esta la formulación que se acerca más a los valores del T0 y del CS10.

La conservación de los NK está correlacionada con el porcentaje de DMSO en las formulaciones. Se observa un efecto dosis dependiente de la formulación PG5% sin DMSO (45,8%) a la formulación DMSO 10% (84,2%). La condición CS10 que contiene el 10% de DMSO es no significativamente diferente del DMSO 10%.

Conclusión del estudio

El presente estudio de congelación se ha realizado por lo tanto sobre 2 lotes de CMN procedentes de anillos de citaféresis de 2 pacientes sanos diferentes. Entre los criterios estudiados, las conclusiones son:

➤ Viabilidad de las células. La criopreservación de los CMN es eficaz en formulación PG 5% (viabilidad estable para el PG 5% con respecto a T0). Los resultados obtenidos a 4h post descongelación son satisfactorios y permiten un uso clínico.

➤ Ensayo de proliferación (CFSE). La congelación de los CMN en la formulación PG 5% no altera la capacidad de proliferación de las células.

➤ Ensayo de desgranulación. La capacidad inmune de la población de linfocitos T dentro de CMN es relativamente variable y dependiente del paciente. Los resultados del primer lote, muy variables, deben relativizarse (fuerte reducción de la funcionalidad en todos los casos). Para el 2º lote, la condición PG 5% da unos resultados satisfactorios (reducción moderada con respecto a T0). A pesar de que los resultados obtenidos post descongelación sean más bajos que los obtenidos para el T0, los linfocitos T conservan una capacidad citotóxica. La condición PG 5% es más eficaz para preservar la funcionalidad de las células.

➤ Fenotipo. La formulación de congelación PG 5% muestra una acción específica: preserva preferiblemente algunas poblaciones celulares. En efecto, la formulación PG 5% es más eficaz para conservar los linfocitos T (helper y citotóxico), contrariamente a los NK.

Ejemplo 3: Ensayo con la formulación según la invención para criopreservar unas células madre mesenquimatosas (MSC)

5 Se ha preparado la formulación siguiente, denominada PG 5%:

Propilenglicol 5% + Coenzima Q10 0,01% + Trehalosa 0,1M + seroalbúmina humana (AH) 4%.

Necesita un tiempo de incubación de 30 minutos máximo a 4°C antes de la congelación.

10 Esta formulación está asociada a un ciclo de reducción de la temperatura automatizada efectuada mediante un CRF (congelador programado) que permite una reducción de temperatura compleja según un ciclo definido. Hasta -40°C, las células se consideran como sensibles: la reducción de la temperatura es lenta y progresiva para permitir la formulación de cristales regulares. Por debajo de este nivel, el producto se considera como estable y la reducción de la temperatura es rápida hasta la temperatura de almacenamiento de -150°C máximo (nitrógeno gaseoso o líquido).

Contexto del estudio

20 Durante el estudio, se han efectuado 2 ciclos, cuyas características se presentan en la tabla siguiente:

Ciclo (nº de lote)	Materia de partida	Comentarios
1 (62535836)	Ampollas de paso 2	Proveedor: ATCC
2 (8900-101)	Ampolla de paso 4	Proveedor: Thermo Scientific

25 Cada ejecución corresponde a un lote de células que proviene de un donante diferente. Para estos 2 ciclos, se han descongelado una ampolla de MSC que proviene de ATCC para el ciclo 1 y una ampolla de Thermo Fisher Scientific para el ciclo 2. Las células se amplificaron durante varias semanas y después se congelaron por CRF a la concentración de:

- 1,2 x 10⁶ células/ml para el ciclo 1;
- 2,5 x 10⁶ células/ml para el ciclo 2.

30 Con el fin de demostrar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado 3 brazos. Para cada brazo, se han descongelado 2 ampollas de 1 ml para el ensayo.

	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3
Congelación	DMSO 10%**	CS10*	PG 5%
Ampollas	1A y 1B	2A y 2B	3A y 3B

* CS10: Cryostor 10, formulación de congelación comercial (STEMCELL Technologies)

** DMSO 10% + AH 4%.

Criterio de evaluación

40 Con el objetivo de evaluar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado diferentes ensayos, presentados en la tabla siguiente, antes de la congelación (denominado T0) y después de la congelación. Los resultados obtenidos con las células descongeladas se compararon con el T0 y se expresaron en % de T0.

T0	Post descongelación	Objetivo
Viabilidad	Viabilidad post descongelación (en la hora)	Criterio general (criterio primario frecuentemente liberatorio que permite la inyección de células, frecuentemente correlacionado con la eficacia y los efectos secundarios (impurezas acelulares: restos, agregados, etc.))
	Viabilidad a 4h post descongelación	
Fenotipo		Caracterización de las subpoblaciones celulares y de las células de interés. En efecto, el ciclo de congelación/descongelación puede afectar específicamente a algunos subtipos más sensibles y modificar el equilibrio del producto inyectado (aumento de las impurezas celulares)
Ensayo de proliferación		Determinación del factor de amplificación de las células y por lo tanto de su capacidad de recogida correlacionada con la actividad metabólica

Se compararon los diferentes brazos mediante un análisis estadístico. La formulación de referencia (brazo 1) es el DMSO 10% + AH 4%.

Durante el análisis estadístico, se ha analizado la homogeneidad de las varianzas mediante un ensayo de Fisher (F-Test, varianza homogénea si $p > 0,05$). Se realizó un ensayo de igualdad de las expectativas con dos observaciones de varianzas iguales o desiguales. Los medios son no significativamente diferentes si $p > 0,05$. Las medias son significativamente diferentes si $p < 0,05$.

Resultados

Análisis de la viabilidad de las células

El análisis de la viabilidad post descongelación demuestra que las condiciones ensayadas son no significativamente diferentes del T0 para todos los brazos congelados (valores $> 98\%$ del T0). Las diferencias demostradas por el análisis estadístico se deben a la variabilidad del ensayo.

Lote	Post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
62535836	% de viabilidad	95,3%	94,9%	95,0%	96,9%	96,8%	93,7%	93,6%
	%T0		99,6%	99,7%	101,7%	101,6%	98,3%	98,2%
8900-101	% de viabilidad	97,5%	96,6%	95,7%	98,6%	98,5%	97,3%	98,5%
	%T0		99,1%	98,2%	101,1%	101,0%	99,8%	101,0%
Media			99,1%		101,4%		99,3%	
F-Ensayo					0,12		0,16	
T-Ensayo					0,00		0,78	

Tabla recapitulativa de la viabilidad de los MSC post descongelación (en % de viabilidad y en % relativo del T0)

El análisis de la viabilidad de las células después de 4 horas a temperatura ambiente en su contenedor primario y su formulación de congelación permite evaluar la estabilidad descongelada de las células (simulación de las condiciones reales de manipulación, transporte y espera antes de la inyección al paciente). Pone en evidencia unos porcentajes de viabilidad estables para los 3 brazos.

Lote	4h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
62535836	% de viabilidad	95,3%	95,6%	94,6%	96,3%	96,5%	92,3%	89,2%
	%T0		100,3%	99,3%	101,0%	101,3%	96,9%	93,6%
8900-101	% de viabilidad	97,5%	92,4%	90,3%	97,6%	95,6%	94,4%	95,4%
	% T0		94,8%	92,6%	100,1%	98,1%	96,8%	97,8%
Media			96,7%		100,1%		96,3%	
F-Ensayo					0,84		0,15	
T-Ensayo					0,14		0,83	

Tabla de análisis de la viabilidad de los MSC a 4h post descongelación (en % de viabilidad y en % relativo del T0)

Para los 2 lotes, después de 4h post descongelación, las variaciones son reducidas (entre el 92 y el 101% del T0). Después del análisis comparativo de la formulación PG 5%, no se demuestra ninguna diferencia significativa con respecto a la referencia (DMSO 10%) así como con el control positivo (CS10). La formulación tiene una capacidad de conservación similar al CS10.

En detalle, la condición DMSO 10% es la más variable entre los 2 lotes de células ensayadas mientras que la formulación CS10 es la más estable.

Al final, las diferencias son reducidas entre las diferentes formulaciones, por lo tanto la viabilidad post descongelación no es un criterio discriminante.

Análisis del fenotipo

Se ha efectuado un fenotipo a fin de determinar la estabilidad de la población de MSC en el producto descongelado. Para los 2 lotes, los porcentajes obtenidos no son significativamente diferentes del T0. La cantidad de células de interés no se ve, por lo tanto, afectada por el proceso de congelación/descongelación.

Lote	Fenotipo		DMSO 10%		CS10		PG 5%	
		T0	1A	1B	2A	2B	3A	3B
62535836	CD73+/90+/105+	96,9%	98,5%	98,6%	98,6%	98,1%	98,7%	98,7%
	%T0		101,7%	101,8%	101,8%	101,2%	101,9%	101,9%
8900-101	CD73+/90+/105+	100,0%	100,0%	99,9%	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%
	%T0		100,0%	99,9%	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%
Media			100,8%		100,7%		100,9%	
F-Ensayo					0,42		0,43	
T-Ensayo					0,91		0,95	

5 Tabla recapitulativa de los resultados obtenidos para el fenotipaje de los MSC
(en % relativo del T0)

Análisis de la proliferación de las células

10 El principio del ensayo de proliferación consiste en inocular 50 000 células en una placa de 6 pocillos y contar el número de células obtenidas después de 7 días en condiciones de proliferación sin cambio de medio. La fase de amplificación de las células tuvo lugar en el mismo medio que el de la fase de cultivo precongelación.

15 Para los 2 ciclos, los ensayos de proliferación han fracasado en las condiciones T0. En el primer caso, de manera inexplicable, las células no se han despegado (estrés) y en el 2º caso, las células se han estancado. Así, el brazo formulado en PG 5% se compara con el brazo control (DMSO 10% y CS10).

Lote	Ensayo de proliferación	DMSO 50%		CS10		PG 5%	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B
62535836	Factor de amplificación	1,8	1,7	2,0	2,4	1,3	1,8
8900-101		2,2	2,1	2,4	2,3	2,3	2,6
Media		2,0		2,3		2,0	
F-Ensayo				0,35		0,13	
T-Ensayo				0,11		0,93	

Tabla recapitulativa de los resultados obtenidos para los ensayos de proliferación de los MSC

20 La capacidad de proliferación de las células se conserva para cada condición descongelada. El análisis estadístico no demuestra una diferencia significativa entre sí. En consecuencia, la formulación PG 5% es equivalente a las referencias.

Conclusión del estudio

25 El presente estudio realizado sobre 2 lotes de MSC humanos procedentes de ampollas comerciales recultivadas demuestra que:

30 ➤ Viabilidad de las células. La criopreservación de los MSC es eficaz en formulación PG 5% en términos de viabilidad celular ya que es siempre superior al 98% del T0. Además, es equivalente al CS10 (control positivo). Los análisis obtenidos a 4h post descongelación son excelentes (ninguna disminución de la viabilidad) y validan una utilización clínica.

35 ➤ Ensayo de proliferación. La congelación de los MSC con las diferentes formulaciones no afecta a la capacidad de proliferación de las células. Sin embargo, en ausencia de T0, no es posible calificarla. Los factores de amplificación obtenidos para las células formuladas en PG 5% no son diferentes de los controles. Esto demuestra la equivalencia de las formulaciones con CS10 (control).

40 ➤ Fenotipo. La formulación de congelación PG 5% preserva perfectamente el porcentaje de células de interés (MSC).

Los 2 lotes de MSC se cultivaron de 2 maneras diferentes, el primer lote recibido de ATCC amplificó durante 1 mes y medio en las condiciones recomendadas por ATCC (medio ATCC + kit de crecimiento), el otro que proviene de Thermo Fischer durante 3 semanas en condición DMEM + concentración reducida de glucosa + suero fetal de ternera (SVF) al 10%. Estas diferencias no tienen impacto sobre los análisis, ya que las tendencias son las mismas para los 2 ciclos.

Ejemplo 4: Ensayos con la formulación según la invención para criopreservar unos fibroblastos

Se ha preparado la formulación siguiente, denominada PG 5%:

Propilenglicol 5% + Coenzima Q10 0,01% + Trehalosa 0,1M + seroalbúmina humana (AH) 4%.

Necesita un tiempo de incubación de 30 minutos máximo a 4°C antes de la congelación.

Esta formulación está asociada a un ciclo de reducción de temperatura automatizada efectuada mediante un CRF (congelador programado) que permite una reducción de temperatura compleja según un ciclo definido. Hasta -40°C, las células se consideran como sensibles: la reducción de la temperatura es lenta y progresiva para permitir la formulación de cristales regulares. Por debajo de este nivel, el producto se considera como estable y la reducción de la temperatura es rápida hasta la temperatura de almacenamiento de -150°C máximo (nitrógeno gaseoso o líquido).

Contexto del estudio

Durante el estudio, se han efectuado 2 ciclos, cuyas características se presentan en la tabla siguiente:

Ciclo (nº de lote)	Materia de partida
1 (FPCCC12080)	Ampolla de paso 7
2 (FPCCC12081)	Ampolla de paso 7

Para estos 2 ciclos, se han descongelado unas ampollas de fibroblastos procedentes de pacientes sanos diferentes. Las células se amplificaron y después se congelaron a la concentración única de 5×10^6 células/ml.

Con el fin de demostrar la eficacia de las formulaciones de congelación, se realizaron 3 brazos. Para cada brazo, se descongelaron 2 ampollas de 1 ml, para el ensayo.

	Brazo 1	Brazo 2	Brazo 3
Congelación	DMSO 10%**	CS10*	PG 5%
Ampollas	1A y 1B	2A y 2B	3A y 3B

* CS10: Cryostor 10, formulación de congelación comercial (STEMCELL Technologies)

** DMSO 10% + AH 4%.

Criterio de evaluación

Con el objetivo de evaluar la eficacia de las formulaciones de congelación, se han realizado diferentes ensayos, presentados en la tabla siguiente, antes de la congelación (denominado T0) y después de la descongelación. Los resultados obtenidos con las células descongeladas se compararon con T0 y se expresaron en % de T0.

T0	Post descongelación	Objetivo
Viabilidad	Viabilidad post descongelación (en la hora)	Criterio general primario frecuentemente liberatorio que permite la inyección de las células, frecuentemente correlacionado con la eficacia y los efectos secundarios (impurezas acelulares: restos, agregados, etc.)
	Viabilidad a 4h post descongelación	
Fenotipo		Caracterización de las subpoblaciones celulares y de las células de interés. En efecto, el ciclo de congelación/descongelación puede afectar específicamente a algunos subtipos más sensibles y modificar el equilibrio del producto inyectado (aumento de las impurezas celulares)
Ensayo de proliferación		Determinación del factor de amplificación de las células y por lo tanto de su capacidad de recogida correlacionada con la actividad metabólica/funcional

Los diferentes brazos se han comparado por un análisis estadístico. La formulación de referencia (brazo 1) es el DMSO 10% + AH 4%.

Durante el análisis estadístico, la homogeneidad de las varianzas se ha efectuado mediante un ensayo de Fisher (F-Test, varianza homogénea si $p > 0,05$). Se realizaba un ensayo de igualdad de las expectativas con dos observaciones de varianzas iguales en caso de varianza homogénea. En el caso de varianza no homogénea, se realizaba un ensayo de igualdad de expectativas con dos observaciones de varianzas diferentes. Las medias no son significativamente diferentes si $p > 0,05$. Las medias son significativamente diferentes si $p < 0,05$.

Análisis

Análisis de la viabilidad de las células

La viabilidad post descongelación confirma la eficacia de congelación sobre todos los brazos (>99% du T0).

Lote	Post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
FPCCC12080	% de viabilidad	98,3%	98,6%	98,2%	98,4%	97,2%	97,9%	97,9%
	%T0		100,3%	99,9%	100,1%	98,9%	99,6%	99,6%
FPCCC12081	% de viabilidad	98,3%	97,7%	98,1%	98,5%	97,8%	96,2%	97,4%
	%T0		99,4%	99,8%	100,2%	99,5%	97,9%	99,1%
Media			99,8%		99,7%		99,0%	
F-Ensayo					0,22		0,12	
T-Ensayo					0,64		0,12	

Tabla de análisis de la viabilidad de los fibroblastos a post descongelación
(en % de viabilidad y en % relativo del T0)

El análisis de la viabilidad de las células después de 4 horas a temperatura ambiente en su contenedor primario permite evaluar la estabilidad descongelada de las células (simulación de las condiciones reales de manipulación, transporte y espera antes de la inyección al paciente).

Lote	4h post descongelación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
FPCCC12080	% de viabilidad	98,3%	98,1%	98,3%	97,0%	97,3%	97,9%	98,2%
	%T0		99,8%	100,0%	98,7%	99,0%	99,6%	99,9%
FPCCC12081	% de viabilidad	98,3%	96,1%	95,5%	97,9%	97,1%	96,9%	96,3%
	%T0		97,8%	97,2%	99,6%	98,8%	98,6%	98,0%
Media			98,7%		99,0%		99,0%	
F-Ensayo					0,03		0,23	
T-Ensayo					0,69		0,71	

Tabla de análisis de la viabilidad de los fibroblastos a 4h post descongelación
(en % de viabilidad y en % relativo del T0)

A 4h post descongelación, la viabilidad de las células sigue estable (no significativamente diferente de T0) para los 2 lotes. Las formulaciones no son tóxicas para las células a temperatura ambiente.

La formulación PG5% tiene el mismo potencial de conservación que el DMSO 10% (referencia) y el CS10 (control positivo), demostrado por la ausencia de diferencia significativa durante el análisis estadístico.

Análisis del fenotipo

Se ha efectuado un fenotipo a fin de determinar la estabilidad de la población de fibroblastos en el producto. Los porcentajes encontrados son estables con respecto al T0. La cantidad de células de interés no se ve, por lo tanto, afectada por el proceso de congelación/descongelación.

Lote	Fenotipo	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
FPCCC12080	CD61+/73+/90+	99,6%	99,7%	99,6%	99,3%	99,7%	99,6%	99,2%
	% a T0		100,1%	100,0%	99,7%	100,1%	100,0%	99,6%
FPCCC12081	CD61+/73+/90+	98,0%	99,8%	99,7%	99,7%	99,9%	99,7%	99,7%

	%T0		101,8%	101,7%	101,7%	101,9%	101,7%	101,7%
Media			100,9%		100,9%		100,8%	
F-Ensayo					0,42		0,43	
T-Ensayo					0,95		0,85	

Tabla recapitulativa de los resultados obtenidos para el fenotipo de los fibroblastos
(en % relativo del T0)

Análisis de la proliferación de las células

- 5 El principio del ensayo de proliferación consiste en inocular 50 000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y en medir el número de células obtenidas después de 3 días de incubación.

Lote	Ensayo de proliferación	T0	DMSO 10%		CS10		PG 5%	
			1A	1B	2A	2B	3A	3B
FPCCC12080	Factor de amplificación	4,8	5,6	4,2	7,3	4,6	5,7	4,7
	%T0		116,3%	86,6%	150,4%	95,3%	117,6%	96,5%
FPCCC12081	Factor de amplificación	1,9	3,0	3,2	2,5	2,7	1,5	1,2
	%T0		157,1%	166,6%	129,0%	143,4%	77,8%	60,5%
Media			131,7%		129,5%		88,1%	
F-Ensayo					0,26		0,26	
T-Ensayo					0,93		0,10	

Tabla recapitulativa de los resultados obtenidos para los ensayos de proliferación de los fibroblastos
(en % relativo del T0).

- 10 Según los resultados obtenidos, las células descongeladas conservan su capacidad de proliferación y no presentan diferencia significativa entre sí.
- 15 Sin embargo, se observa una tendencia a la reducción en el brazo 3 (PG 5%) en comparación con la formulación de referencia DMSO 10% y al T0, especialmente sobre el lote FPCCC12081 o el valor en % del T0 medio es del 69,2% frente al 161,9% para el DMSO 10%. Esta tendencia no se encuentra durante el primer ciclo y depende seguramente del paciente.
- 20 Conclusión del estudio
- El presente estudio de congelación se ha realizado por lo tanto sobre 2 lotes de fibroblastos humanos de donantes diferentes. Entre los criterios estudiados, las conclusiones son:
- 25 ➤ Viabilidad de las células. La criopreservación de los fibroblastos es eficaz en formulación PG 5% en términos de viabilidad celular, ya que es siempre superior al 97% del T0. Además, es equivalente al CS10 (control positivo). Los análisis obtenidos a 4h post descongelación son satisfactorios (ninguna disminución observable de la viabilidad) y permiten un uso clínico.
- 30 ➤ Ensayo de proliferación. La capacidad de proliferación de los fibroblastos depende del lote considerado. Para el primer lote, las células no se ven afectadas por la congelación, lo que se traduce por unos factores de amplificación superiores o iguales a T0 para los 4 brazos. Para el 2º ciclo, los porcentajes de amplificación son mejores para las células descongeladas salvo la condición PG 5% (un 69,2% de T0).
- 35 ➤ Fenotipo. La formulación de congelación PG 5% preserva eficazmente el porcentaje de células de interés (fibroblastos).

REIVINDICACIONES

1. Composición de crioconservación que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

- a) albúmina humana,
- b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos,
- c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, y
- d) células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracciones de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenido en la extracción de nódulos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedente de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que el sacárido se selecciona entre los disacáridos.

3. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que el sacárido es un disacárido seleccionado entre la trehalosa y la sacarosa.

4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la albúmina humana está presente en una cantidad comprendida entre el 2 y el 10% en peso con respecto al peso total de la composición, preferentemente entre el 2,5 y el 6% en peso.

5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que el disacárido está presente en una concentración comprendida entre 0,05M y 1M, preferentemente entre 0,07M y 0,5M.

6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que las células con objetivo terapéutico se seleccionan entre las células NK, los monocitos, los linfocitos B, los linfocitos T, naturales o genéticamente modificados, tales como los linfocitos T reguladores, los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos T auxiliares (o helper) y los linfocitos T que tienen un receptor antigénico quimérico (CAR), los mioblastos humanos, las células madre hematopoyéticas, las células cepas mesenquimatosas, las células cardíacas, los fibroblastos y cualquier otra célula natural o genéticamente modificada.

7. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que comprende:

- a) albúmina humana, preferentemente en una cantidad comprendida entre el 2,5 y el 6% en peso,
- b) trehalosa, preferentemente en una concentración comprendida entre 0,07M y 0,5M,
- c) coenzima Q10 y propano-1,2-diol, preferentemente en una cantidad respectivamente comprendida entre el 0,007 y el 0,1% en peso, y en una cantidad comprendida entre el 3 y el 10% en volumen, y
- d) unas células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de extracciones de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, y después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedentes de la etapa de aparición, y por último la amplificación de los des linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

8. Procedimiento de crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos que infiltran el tumor, que comprende las etapas siguientes:

i) mezcla de la muestra de células con objetivo terapéutico con:

- a) albúmina humana,
- b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y
- c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, después

ii) congelar la mezcla obtenida en la etapa i),

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenido en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedentes de la etapa de aparición, y al final la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.

9. Procedimiento de crioconservación según la reivindicación 8, caracterizado por que la congelación ii) se efectúa hasta una temperatura comprendida entre -100°C y -180°C, preferentemente comprendida entre -140°C y -160°C.

10. Procedimiento de crioconservación según una de las reivindicaciones 8 u 9, caracterizado por que la congelación ii) se realiza colocando la mezcla obtenida en i) en un recipiente sumergido en una mezcla de alcohol de isopropilo a +4°C, poniéndose el conjunto a una temperatura comprendida entre -70°C y -100°C.

11. Procedimiento de crioconservación según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que la congelación ii) se efectúa con la ayuda de un congelador programado.

12. Utilización de una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable:

a) albúmina humana,

b) al menos un sacárido seleccionado entre los disacáridos y los trisacáridos, y

c) coenzima Q10, y al menos un alcanodiol de C3-C5, para la crioconservación de al menos una muestra de células con objetivo terapéutico, con la excepción de linfocitos que infiltran el tumor,

obteniéndose dichos linfocitos que infiltran el tumor por cultivo *in vitro* de linfocitos que infiltran el tumor a partir de una extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis de un paciente que padece un melanoma de fase 3 o 4, comprendiendo dicho cultivo la aparición de dichos linfocitos que infiltran el tumor contenidos en la extracción de nódulos cutáneos en tránsito, ganglios o metástasis, después la estimulación de los linfocitos que infiltran el tumor procedentes de la etapa de aparición, y al final la amplificación de los linfocitos estimulados que infiltran el tumor.