

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 897**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016 PCT/EP2016/075407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17068140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016 E 16787784 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3365432**

54 Título: **Terapia con células madre basada en células madre procedentes de tejido adiposo**

30 Prioridad:

23.10.2015 EP 15191213

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

24.02.2021

73 Titular/es:

RIGSHOSPITALET (100.0%)

Blegdamsvej 9

2100 Copenhagen Ø, DK

72 Inventor/es:

KASTRUP, JENS;

EKBLOND, ANNETTE y

HAACK-SØRENSEN, MANDANA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 807 897 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

Terapia con células madre basada en células madre procedentes de tejido adiposo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a células madre procedentes de tejido adiposo (ASC, por sus siglas en inglés) y a composiciones, así como a métodos para preparar y usar dichas ASC y composiciones para terapia.

10 **Antecedentes de la invención**

Una multitud de estudios clínicos previos han establecido que las células del estroma mesenquimatosas (MSC, por sus siglas en inglés) de la médula ósea así como del tejido adiposo tienen capacidades regenerativas significativas. Las células del estroma mesenquimatosas de ambos tejidos de origen mejoran la regeneración a través de mecanismos paracrinos, liberando sustancias extracelulares que promueven mecanismos de reparación endógenos naturales que incluyen remodelación de la matriz, revascularización y modulación inmunitaria.

Las MSC han demostrado ser seguras y eficaces en el tratamiento de la arteriopatía coronaria estable grave y la angina refractaria y la cardiopatía isquémica crónica (por ejemplo, Mathiasen *et al.*, 2012; Mathiasen *et al.*, 2013). La seguridad clínica del tratamiento de la isquemia miocárdica crónica con ASC también se ha documentado (Qayyum *et al.*, 2012; Ekblond, 2015). Las MSC también tienen propiedades inmunosupresoras, procedentes de su capacidad para inhibir o detener la maduración de células dendríticas y la proliferación de linfocitos T, linfocitos B y células NK, y se están explorando para el tratamiento de varios trastornos autoinmunitarios u otros trastornos inflamatorios (Gebler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Sin embargo, los métodos actuales de producción de ASC y la logística clínica son menos que óptimos, evitando una amplia difusión de este tipo de tratamiento. Por tanto, existe una necesidad de métodos seguros y eficaces para producir y conservar preparaciones de ASC alogénicas de alta calidad adecuadas para una amplia gama de aplicaciones terapéuticas.

El documento WO 2014/203267 (Kaziak Research PVT Ltd.) se refiere a un método para el aislamiento, purificación y expansión a escala industrial de MSC procedentes de tejido adiposo humano y su uso en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1, isquemia crítica de extremidades y otros trastornos.

El documento WO 2006/037649 (Cellerix S.L. y la Universidad Autónoma de Madrid) se refiere a la identificación y aislamiento de células multipotentes del tejido mesenquimatoso no osteocondral, caracterizado por determinados marcadores.

A pesar de estos y otros progresos en la materia, todavía existe una necesidad de nuevas tecnologías de fabricación y formulación para ASC.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que las preparaciones de ASC "listas para usar" de alta calidad se pueden producir y congelar de manera eficaz a una alta concentración en un crioprotector libre de proteínas. Las preparaciones de ASC congeladas están, cuando se descongelan, listas para uso clínico. Además, las preparaciones de ASC tienen propiedades inmunosupresoras, lo que las hace adecuadas tanto para uso autólogo como alogénico, *por ejemplo*, en terapia inmunosupresora.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso que prepara una composición farmacéutica que comprende una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas, que comprende las siguientes etapas:

- (i) añadir la fracción vascular estromal (SVF, por sus siglas en inglés) de un lipoaspirado recogido de un donante a un biorreactor en donde al menos una superficie se trata previamente para promover la adhesión de células madre humanas adultas;
- (ii) en el biorreactor, cultivar células adherentes para confluencia en un medio de cultivo libre de suero complementado con lisado de plaquetas humanas;
- (iii) separar las células adherentes;
- (iv) congelar las células separadas en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos 1×10^6 células/ml;
- (v) descongelar las células congeladas y repetir las etapas (ii) y (iii), y opcionalmente (iv), al menos una vez,
- (vi) congelar las células separadas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células/ml; y
- (vii) opcionalmente, descongelar la composición congelada.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición, tal como una composición farmacéutica, que

comprende una suspensión de una población sustancialmente homogénea e inmunosupresora de células madre humanas adultas procedentes de tejido adiposo en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células por ml. La composición está opcionalmente congelada. En una realización, la composición se prepara usando el proceso del primer aspecto.

5 En una realización, al menos aproximadamente un 80 % de la población de ASC expresa CD90, CD73, CD13, CD105, CD29, CD166, CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LT β R y como máximo aproximadamente un 15 % de la población de ASC expresa CD45, CD19, CD14, CD106, CD31 y CD36.

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de dicha composición como medicamento, por ejemplo, para inmunosupresión, para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario u otro trastorno inflamatorio, y para el tratamiento de trastornos isquémicos u otros trastornos caracterizados por la destrucción de tejido. En una realización, la composición se usa en un método para tratar la cardiopatía isquémica, administrando normalmente la composición mediante inyección intramiocárdica directa. Se contempla particularmente la terapia alogénica, es decir, donde el donante de las ASC no es el paciente al que se le administrará la composición.

Estos y otros aspectos y realizaciones se explican con más detalle a continuación.

20 Leyendas de las figuras

La Figura 1 representa los procesos de producción de ASC de acuerdo con algunas realizaciones de la invención.

25 Divulgación detallada de la invención

La presente invención se refiere a un producto de células madre basado en ASC aisladas de donantes sanos, normalmente mediante dos rondas de expansión de las ASC en un biorreactor separadas por una etapa de crioconservación, dando como resultado una composición adecuada para la crioconservación en un banco de células. El producto es útil como un fármaco terapéutico alogénico, por ejemplo, para terapia regenerativa en trastornos o enfermedades caracterizadas por isquemia u otra destrucción tisular, tal como enfermedad cardíaca con y sin insuficiencia cardíaca, para inmunosupresión de reacciones autoinmunitarias o rechazo de trasplante, o terapia antiinflamatoria de enfermedades inflamatorias. En particular, la composición de ASC se puede usar como un producto crioconservado listo para usar, almacenado en, por ejemplo, nitrógeno líquido, y listo para usar directamente después de la descongelación. La composición de ASC se puede administrar por vía intravenosa, intraarterial o mediante infusión o inyección directa en un tejido, por ejemplo, miocardio.

Por otra parte, un banco de células que comprende múltiples preparaciones de ASC de diferentes donantes de acuerdo con la invención puede proporcionar un tratamiento personalizado, por ejemplo, permitiendo el emparejamiento de tejidos entre el donante y el receptor antes del tratamiento, varios tratamientos del receptor y, en caso de que el receptor necesite varios tratamientos, la posibilidad de cambiar ASC de un donante a otro. Esto último es particularmente útil en caso de que el receptor desarrolle una respuesta de aloanticuerpos a las ASC a partir de una preparación de ASC administrada anteriormente.

45 Definiciones

"ASC", "células madre procedentes de tejido adiposo", "células estromales procedentes de tejido adiposo" y similares, se refieren a células madre del estroma multipotentes, también conocidas como células madre mesenquimatosas, células estromales multipotentes, células madre multipotentes y células estromales/madre mesenquimatosas, que proceden del tejido adiposo. Determinados criterios para identificar ASC son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bourin *et al.* (2013). En algunas realizaciones, las ASC se caracterizan por su capacidad para diferenciarse a lo largo de linajes adipocíticos, condroblásticos y osteoblásticos en condiciones apropiadas. Las ASC en cultivo pueden caracterizarse por la expresión de uno o más de los siguientes marcadores de la superficie celular: CD90, CD73, CD105 y la falta de expresión de CD45 y CD31. En algunas realizaciones, se pueden distinguir de las MSC procedentes de médula ósea por su positividad para CD36 y negatividad para CD106.

La población de células madre preparada de acuerdo con el método inventivo descrito en el presente documento es "sustancialmente homogénea", lo que significa que la mayoría de las células cumplen con los patrones de ASC. Normalmente, una población de ASC sustancialmente homogénea en una composición de acuerdo con la presente invención se caracteriza por al menos aproximadamente un 80 % de la población de ASC que expresa CD90, CD105, CD13, CD73, CD166, CD29, y, opcionalmente, CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LT β R; y por como máximo aproximadamente un 15 % de la población de ASC que expresa CD45, CD31, CD14 y CD19. En algunas poblaciones de ASC de la invención, uno o más de CD90, CD73, CD13, CD105, CD29, CD166, CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LT β R se pueden expresar en al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 %, tal como al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 97 % o más de la población de ASC. De forma análoga, en algunas

poblaciones de ASC de las composiciones de la invención, uno o más de CD45, CD19, CD14, CD106, CD31 y CD36 se pueden expresar como máximo en aproximadamente un 15%, tal como como máximo aproximadamente un 12 %, tal como como máximo aproximadamente un 10 %, tal como como máximo aproximadamente un 7 %, tal como como máximo aproximadamente un 5 %, tal como como máximo aproximadamente un 3% o menos de la población de ASC.

5 Los intervalos específicos contemplados para estos y otros marcadores son aquellos definidos por los porcentajes de expresión mínimos y máximos de una población de ASC como se muestra en las Tablas 15 y 20.

Por "adiposo" se entiende cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón o blanco, procedente del área abdominal u otro sitio de tejido adiposo. En determinadas realizaciones, el adiposo es tejido

10 adiposo blanco subcutáneo o tejido adiposo visceral o cualquier otro tejido que contenga células adiposas. El tejido adiposo puede ser de cualquier mamífero. Preferentemente, el tejido adiposo es humano, lo más preferentemente de un ser humano adulto. Una fuente conveniente de tejido adiposo es la cirugía de liposucción.

Un "lipoaspirado", tal como se usa en el presente documento, se refiere al material eliminado durante la liposucción a

15 través de un aspirador, es decir, un dispositivo de succión. El lipoaspirado comprende adipocitos, grasa, tejido conectivo, vasos sanguíneos y una fracción vascular estromal. Se puede usar cualquier tipo de método de liposucción conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitación, liposucción asistida por succión, asistida por ultrasonido, asistida por potencia, asistida por doble cánula, asistida por láser y liposucción asistida por agua (WAL, por sus siglas en inglés). La WAL es, sin embargo, una de las opciones preferidas. La "fracción vascular estromal" o "SVF" se puede

20 aislar luego del lipoaspirado usando métodos conocidos en la técnica, y ejemplificados a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "biorreactor" se refiere a cualquier dispositivo en el que se desarrollan procesos biológicos y/o bioquímicos en condiciones ambientales y operativas monitoreadas y controladas, por ejemplo, pH, temperatura, suministro de gas/aire y nutrientes y eliminación de desechos.

25

El término "crioconserva" o sus diversas formas gramaticales, como se usa en el presente documento, se refiere a la conservación de células para su almacenamiento en un crioprotector a temperaturas bajo cero. Para el almacenamiento a largo plazo, los crioviales que contienen las células y el crioprotector generalmente se colocan en nitrógeno líquido.

30

El término "crioprotector", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que minimiza la formación de cristales de hielo en una célula o tejido, cuando la célula o tejido se enfría a temperaturas bajo cero y da como resultado un daño sustancialmente menor a la célula o tejido después del calentamiento en comparación con el efecto de enfriamiento sin crioprotector.

35

La "viabilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la característica de las células de no absorber el tinte impermeabilizante de membrana (por ejemplo, azul Trypan, FVS-780, azul SYTOX, yoduro de propidio), lo que demuestra la integridad de la membrana celular.

40

La "capacidad de proliferación", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células para multiplicarse en un medio de cultivo adecuado. La capacidad de proliferación puede, por ejemplo, representarse por el número relativo de células después de un período de cultivo de 24 h, 48 h o 72 h en comparación con el número de células inicialmente colocadas en la placa. Esto también se puede expresar como "duplicaciones de la población" durante un determinado período. Por ejemplo, una duplicación de la población de al menos 1 durante 48 h en cultivo celular significa que el número de células sembradas se ha duplicado al menos una vez durante ese período.

45

Tal como se usa en el presente documento, el término "donante" se refiere al ser humano o mamífero del que se extrae el tejido adiposo, normalmente mediante liposucción. Preferentemente, el ser humano es un adulto.

50

Los términos "tratamiento", "terapia" y similares se usan en el presente documento para referirse generalmente a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a la prevención completa o parcial de una enfermedad o de un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en cuanto a la estabilización o curación parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad.

"Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad de un mamífero, particularmente un sujeto humano o veterinario, e incluye: (a) evitar la aparición de la enfermedad o síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o síntoma, pero aún no se ha diagnosticado que la padece; (b) inhibir el síntoma de enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar el síntoma de enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o síntoma.

55

En el contexto del uso terapéutico de las composiciones farmacéuticas divulgadas, en la terapia 'allogénica', el donante y el receptor son individuos genéticamente diferentes de la misma especie, mientras que en la terapia 'autóloga', el donante y el receptor son el mismo individuo.

60

Los términos "receptor", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren al sujeto mamífero para el que se desea tratamiento o terapia, en particular, seres humanos.

65

Realizaciones específicas de la invención

Proceso:

5 El proceso de acuerdo con la invención ofrece una tecnología de fabricación segura y eficaz basada en, por ejemplo, la combinación de lisado de plaquetas humanas como complemento de crecimiento para ASC, expansión en un sistema de biorreactor cerrado y formulación final de ASC como un producto alogénico criopreservado listo para usar con ASC de alta calidad.

10 En la Figura 1 se muestra una descripción general del proceso de acuerdo con algunas realizaciones diferentes.

Normalmente, usando el proceso de la invención, la preparación de un lote de producto de ASC a partir de una SVF solo lleva de aproximadamente 15 a aproximadamente 18 días, excluyendo el tiempo en criopreservación. La eficacia de expansión es particularmente sorprendente, teniendo en cuenta que de una prueba de SVF en el biorreactor de se puede obtener un rendimiento promedio de 11 ± 5 viales de productos intermedios (media de 3 pruebas de SVF), cada uno de los cuales genera un rendimiento de lote promedio de 5 ± 2 ampollas de producto final (basado en un promedio de 8 pruebas en biorreactor de ASC). Por lo tanto, se puede obtener un rendimiento promedio de 55 crioviales con aproximadamente 110 millones de ASC en cada uno a partir de aproximadamente 100 millones de células mononucleares (MNC, por sus siglas en inglés) en la SVF. Adicionalmente, como se describe en los Ejemplos, el producto de ASC se caracteriza por una alta viabilidad (promedio $90 \pm 2\%$), según se determina inmediatamente después de descongelar el producto de ASC del segundo paso.

En una realización, el proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas, comprende las etapas de

- 25
- (i) añadir la SVF de un lipoaspirado recogido de un donante a un biorreactor en donde al menos una superficie se trata previamente para promover la adhesión de células madre humanas adultas;
 - (ii) en el biorreactor, cultivar células adherentes para confluencia en un medio de cultivo libre de suero complementado con lisado de plaquetas humanas;
 - 30 (iii) separar las células adherentes;
 - (iv) congelar las células separadas en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos 1×10^6 células/ml;
 - (v) descongelar las células congeladas y repetir las etapas (ii) a (iii) al menos una vez,
 - (vi) congelar las células separadas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células/ml; y
 - 35 (vii) opcionalmente, descongelar la composición congelada.

La divulgación también permite un proceso para preparar una composición que comprende una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas, que comprende las etapas de

- 40
- (i) añadir la SVF de un lipoaspirado recogido de un donante a un biorreactor en donde al menos una superficie se trata previamente para promover la adhesión de células madre humanas adultas;
 - (ii) en el biorreactor, cultivar células adherentes para confluencia en un medio de cultivo libre de suero complementado con lisado de plaquetas humanas;
 - (iii) separar las células adherentes;
 - 45 (iv) repetir las etapas (ii) y (iii) al menos una vez;
 - (v) congelar las células separadas a una concentración de al menos 1×10^7 células/ml; y, opcionalmente,
 - (vi) descongelar la composición congelada.

En una realización, el proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas comprende las etapas de

- 50
- (i) añadir la fracción vascular estromal (SVF) de un lipoaspirado recogido de un donante a un biorreactor en donde al menos una superficie se trata previamente para promover la adhesión de células madre humanas adultas;
 - (ii) cultivar células adherentes de la SVF para confluencia en un medio de cultivo libre de suero complementado con lisado de plaquetas humanas;
 - 55 (iii) separar las células adherentes;
 - (iv) congelar las células separadas en un crioprotector a una concentración de al menos 1×10^6 millones de células/ml;
 - (v) descongelar las células congeladas y repetir las etapas (ii) a (iv), congelando las células separadas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células/ml; y, opcionalmente,
 - 60 (vi) descongelar la composición congelada.

La SVF se aísla de un lipoaspirado obtenido de un donante sano, por ejemplo, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml o 500 ml, tal como entre 100-300 ml, de lipoaspirado. Normalmente, el tejido adiposo se separa primero del tejido no adiposo utilizando un recipiente de recolección de tejido que utiliza técnicas de decantación, sedimentación o centrifugación para separar los materiales. El tejido adiposo se puede desagregar luego usando métodos tales como fuerza mecánica

(picadura o fuerzas de corte), digestión enzimática con una o más enzimas proteolíticas, tales como colagenasa, tripsina, TrypLe Select, lipasa, liberasa HI, pepsina o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Después de eso, las células restantes se pueden recuperar mediante filtración, centrifugación o similares. Se describen ejemplos de métodos para recuperar la SVF de un lipoaspirado en Godthardt, *et al.* (2008) MACS Miltenyi Biotec Information Pamphlet y el documento WO 2014/138383.

En una realización, se obtienen aproximadamente 100 ml de lipoaspirado de un donante mediante liposucción del abdomen bajo anestesia local. El lipoaspirado se lava dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) pH 7,4 para eliminar la sangre residual. El tejido adiposo se digiere luego mediante incubación con colagenasa disuelta en una solución salina equilibrada a 37 °C durante 45 minutos en rotación constante. La colagenasa se neutraliza con medio que contiene 5 % de lisado de plaquetas humanas y 1 % de penicilina/estreptomina y se filtra a través de un filtro de 100 µm. Las células restantes se centrifugan a 1200 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se resuspenden y se cuentan usando un contador de células de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Al menos una superficie del biorreactor se trata previamente para facilitar o promover la adhesión de ASC, ya sea por el fabricante del biorreactor o en algún punto temporal elegido antes de iniciar el proceso de producción. Se conocen en la técnica varios tipos de tratamientos para promover la adhesión celular e incluyen, por ejemplo, el tratamiento de cultivo de tejidos y recubrimiento con polímeros sintéticos cargados, nanofibras, mucopolisacáridos y diversas composiciones proteicas. Para el tratamiento del cultivo de tejidos, una superficie a base de poliestireno en el biorreactor se modifica con gas plasma, lo que da como resultado que la superficie plástica hidrófoba se vuelva más hidrófila, promoviendo la carga negativa neta la unión celular. En cuanto al revestimiento previo de la superficie, las composiciones proteicas útiles para este propósito pueden comprender una o más proteínas plasmáticas tales como, por ejemplo, fibrinógeno, fibronectina, Factor VIII, factor von Willebrand y Factor XIII; una o más proteínas de matriz extracelulares tales como, por ejemplo, colágenos y lamininas; y/o uno o más proteoglicanos. En una realización, la composición proteica comprende o consiste en uno o ambos de fibrinógeno y fibronectina. En una realización, la composición proteica comprende o consiste en crioprecipitado. El crioprecipitado es un producto sanguíneo bien conocido preparado a partir de plasma, por ejemplo, donde el plasma nuevo se congela y descongela y se recoge el precipitado. El producto normalmente contiene fibrinógeno y Factor VIII, así como, por ejemplo, factor von Willebrand, Factor XIII y fibronectina. En algunas realizaciones, el crioprecipitado contiene al menos 140 mg o más de fibrinógeno por 70 UI de Factor VIII, opcionalmente preparado a partir de donantes de sangre AB o de bajo cantidad de A. En otra realización, la composición proteica comprende o consiste en lisado de plaquetas humanas, que se describe a continuación.

Las clases básicas de biorreactores adecuados para usar en el proceso de la presente invención incluyen biorreactores de fibra hueca y sistemas de perfusión de balanceo, giro o rotación, con o sin microportadores o discos, adecuados para la expansión celular dependiente del anclaje. Preferentemente, el biorreactor es un sistema funcionalmente cerrado o protegido mediante filtros de barrera estériles, capaz de proporcionar un suministro continuo de medio de cultivo y una eliminación continua de desechos durante el cultivo celular. Los más preferidos son los biorreactores de fibra hueca desechables encerrados en una incubadora, que proporcionan un área superficial para la unión celular de al menos 0,5 m², tal como al menos 1 m², tal como al menos 1,5 m², tal como al menos 2 m², tal como entre 1 a 3 m². Preferentemente, el área superficial es al menos 2 m², tal como aproximadamente 2,1 m². Un ejemplo de dicho biorreactor es el Sistema cuántico de expansión celular (en el presente documento también denominado "biorreactor cuántico") que se alimenta a través de dos circuitos de circulación con entradas para medios y reactivos o células, eliminándose los desechos en una bolsa de desechos. Como se muestra en el Ejemplo 7, la expansión de las ASC en un biorreactor aumentó significativamente la tasa de expansión y el rendimiento en relación con el procesamiento manual en matraces de cultivo de tejidos estándar.

Antes de cargar la SVF (o las ASC de primer paso) en los biorreactores, el sistema se puede cebar con un tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, y posteriormente cargarse con una proteína u otra composición para el recubrimiento. Antes de cargar las células, el tampón se puede lavar del sistema y reemplazar con medio completo.

Luego, las células se pueden añadir al biorreactor. Por ejemplo, se pueden cargar aproximadamente 10, 20, 50, 100, 200 o 500 millones de células mononucleares (MNC) de la preparación de la SVF o aproximadamente 5, 10, 20, 50 o 100 millones de ASC del primer paso en el biorreactor cebado y recubierto a través de la entrada, opcionalmente, a través de un filtro. Preferentemente, para las MNC, se cargan aproximadamente 100 millones de células de la SVF. Para el segundo paso, preferentemente, se cargan aproximadamente de 5 a 50 millones de células de las ASC del primer paso, tal como entre 5 y 30, 5 y 25, 10 y 30 o entre 15 y 25 millones de células. Para cualquier paso superior de las células (es decir, 3^{er} paso, 4^o paso, etc.), las células se pueden añadir en cantidades similares al segundo paso. Luego se permite que las células se adhieran durante un período de tiempo suficiente, tal como al menos durante 5 h y/o hasta aproximadamente 24 h, después de lo cual se activa la alimentación continua con medios. Por ejemplo, la velocidad de alimentación del medio puede comenzar en aproximadamente 0,1 ml/min, y luego ajustarse en función de las mediciones de glucosa y/o lactato y/o la expansión celular.

Se puede usar cualquier medio de cultivo celular estándar, tal como, por ejemplo, Medio de Eagle modificado de

Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés), Medio esencial mínimo alfa (a-MEM, por sus siglas en inglés). Como se muestra en el Ejemplo 6, sin embargo, el uso de un producto de lisado de plasma humano (HLP, por sus siglas en inglés) fue claramente un complemento de crecimiento más eficaz en términos de capacidad proliferativa que el uso de FBS, sin comprometer la estabilidad genómica. El HPL es normalmente un líquido turbio, de color amarillo claro que se obtiene de las plaquetas de la sangre humana después de uno, dos, tres o más ciclos de congelación/descongelación. Estos ciclos hacen que las plaquetas se lisen, liberando su contenido intracelular, incluyendo los factores de crecimiento y similares, en el medio circundante. Algunas preparaciones de HPL incluyen factores de coagulación de la sangre, en cuyo caso puede ser ventajoso añadir un anticoagulante tal como heparina para evitar la coagulación. Se pueden procesar otras preparaciones de HPL para eliminar o de otra manera inhibir el efecto de los factores de coagulación. Las preparaciones de HPL, algunas de las cuales son de grado GMP, están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Compass Biomedical, Inc., Cook General Biotechnology, Macopharma SA, Cook Regentech, Mill Creek, iBiologics y Trinova Biochem GmbH bajo las líneas de productos PLUS, Stemulate, Lisado de plaquetas humanas, PLTMax, XcytePlus y complementos de medios CRUX RUFA. Preferentemente, el medio de cultivo para las ASC comprende de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, tal como de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 15 %, tal como de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 %, tal como de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, tal como aproximadamente un 5 %, 8 % o 10 % de HPL. Preferentemente, el medio de cultivo comprende de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 15 % de HPL en, por ejemplo, MEM. Una preparación de HPL preferida es Stemulate, que no requiere la adición de heparina (Documento WO 2015031465 A1).

Una vez que el crecimiento celular ha alcanzado o casi alcanzado su fase estacionaria, como se determina mediante, por ejemplo, el estancamiento en el consumo de glucosa y/o la producción de lactato, las ASC se recolectan, normalmente cargando TrypLe Select en el sistema. Luego, las células recolectadas se pueden lavar y transferir a tubos de centrifuga, granularse y contarse.

Luego, las ASC del primer paso ("intermedias") se pueden crioconservar o, como alternativa, cargar directamente en el biorreactor recubierto previamente para una segunda (o 3^a, 4^a, etc.) ronda de expansión. Para la crioconservación, las ASC intermedias se suspenden en crioprotector a una concentración de al menos aproximadamente 1×10^6 células por ml, tal como al menos aproximadamente 2×10^6 células por ml, al menos aproximadamente 5×10^6 células por ml, al menos aproximadamente 10×10^6 células por ml, al menos aproximadamente 15×10^6 células por ml, al menos aproximadamente 20×10^6 células por ml, o al menos aproximadamente 50×10^6 células por ml, tal como entre 1×10^6 y 50×10^6 células por ml, tal como entre 1×10^6 células o 20×10^6 células por ml.

Las ASC del segundo (o superior, tal como el 3^{er}, 4^o, etc.) paso se pueden crioconservar. Para la crioconservación, las ASC del segundo paso (o superior) se suspenden en crioprotector a una concentración de $1,5 \times 10^7$ células por ml, al menos aproximadamente 2×10^7 células por ml, al menos aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células por ml, al menos aproximadamente 3×10^7 células por ml, al menos aproximadamente 5×10^7 células por ml, o al menos aproximadamente 10×10^7 células por ml, tal como entre 1×10^7 y 5×10^7 células por ml, tal como entre 2×10^7 células o 3×10^7 células por ml. En una realización, las ASC del segundo paso (o superior, tal como el 3, 4^o, etc.) se suspenden en crioprotector a una concentración de aproximadamente 2×10^7 células por ml de crioprotector, tal como aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células por ml de crioprotector. Tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto lo contradiga, 2×10^7 células por ml incluye o corresponde a de $1,6 \times 10^7$ a $2,4 \times 10^7$ células por ml y aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células por ml incluye o corresponde a de 2,0 a 2,4 células por ml.

El crioprotector es preferentemente libre de proteínas, libre de endotoxinas y estéril. Si bien están disponibles varios crioprotectores adecuados, los ejemplos no limitantes de crioprotectores contemplados para las composiciones de ASC de la presente invención son CryoStor® (BioLife Solutions), que incluye CryoStor CS2, CryoStor CS5 y CryoStor CS10; y ProFreeze (Lonza). Los medios de congelación CryoStor son estériles, libres de suero, proteínas y componentes animales, con un pH de 7,5 a 7,7 y un nivel de endotoxinas por debajo de 1 UE/ml. En una realización, el crioprotector es Hypothermosol® (CMS, Rockville, Md.) más DMSO al 10 % (Documento WO 2000/002572 A1). Hypothermosol® comprende Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺Cl⁻, H₂PO₄⁻, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40 (es decir, dextrano con un PM promedio de 40.000 Da), adenosina y glutatión (Documento WO 2010/064054 A1). De acuerdo con el fabricante, ProFreeze debe complementarse con DMSO al 10 % al momento de su uso. Por esto, se hace referencia a los documentos WO 2000/002572 A1 y WO 2010/064054 A1.

En cualquier realización en el presente documento donde se usa DMSO, el DMSO se puede reemplazar por un glucano tal como, por ejemplo, dextrano, que tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 35000 a 45000 Da, tal como, por ejemplo, dextrano-40.

En una realización, el crioprotector comprende entre un 5 % y un 15 % de DMSO, tal como aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 12 % o aproximadamente un 15 % de DMSO, y Trolox, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺Cl⁻, H₂PO₄⁻, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión. Preferentemente, el crioprotector comprende aproximadamente un 10 % de DMSO.

En una realización, el crioprotector comprende una mezcla de DMSO de 1:10 a aproximadamente 1:20 y una solución acuosa que comprende

- 5 (a) uno o más electrolitos seleccionados del grupo que consiste en iones de potasio a una concentración que varía de aproximadamente 35-45 mM, iones de sodio que varían de aproximadamente 80-120 mM, iones de magnesio que varían de aproximadamente 2-10 mM e iones de calcio que varían de aproximadamente 0,01-0,1 mM;
- (b) un agente oncótico macromolecular que tiene un tamaño suficientemente grande para limitar el escape del sistema de circulación y eficaz para mantener una presión oncótica equivalente a la del plasma sanguíneo y seleccionado del grupo que consiste en seroalbúmina humana, polisacárido y almidón coloidal;
- 10 (c) un tampón de pH biológico eficaz en condiciones fisiológicas e hipotérmicas;
- (d) una cantidad nutritiva eficaz de al menos un azúcar simple;
- (e) una cantidad eficaz de manitol que elimina los radicales hidroxilo e impermeables;
- (f) un anión impermeante impermeable a las membranas celulares y eficaz para contrarrestar la hinchazón celular durante la exposición al frío, siendo dicho ion impermeante al menos un miembro seleccionado del grupo que
- 15 (g) un sustrato eficaz para la regeneración de ATP, siendo dicho sustrato al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en adenosina, fructosa, ribosa y adenina; y
- (h) glutatión.

20 En una realización, el crioprotector comprende una mezcla de DMSO de 1:10 a aproximadamente 1:20 y una solución acuosa que comprende

- a) . uno o más electrolitos seleccionados del grupo que consiste en iones de potasio a una concentración que varía de 35-45 mM, iones de sodio que varían de 80-120 mM, iones de magnesio que varían de 2-10 mM e iones de
- 25 calcio que varían de 0,01-0,1 mM;
- b) . un agente oncótico macromolecular que tiene un tamaño suficientemente grande para limitar el escape del sistema de circulación y eficaz para mantener una presión oncótica equivalente a la del plasma sanguíneo y seleccionado del grupo que consiste en seroalbúmina humana, polisacárido y almidón coloidal;
- c) . un tampón de pH biológico eficaz en condiciones fisiológicas e hipotérmicas;
- 30 d) . una cantidad nutritiva eficaz de al menos un azúcar simple;
- e) . una cantidad eficaz de manitol que elimina los radicales hidroxilo e impermeables;
- f) . un anión impermeante impermeable a las membranas celulares y eficaz para contrarrestar la hinchazón celular durante la exposición al frío, siendo dicho ion impermeante al menos un miembro seleccionado del grupo que
- 35 (g) . un sustrato eficaz para la regeneración de ATP, siendo dicho sustrato al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en adenosina, fructosa, ribosa y adenina y
- h) . al menos un agente que regula la muerte celular inducida por apoptóticos.

40 La suspensión de ASC del primer, segundo (o superior) paso en el crioprotector se añade luego a crioviales. Para las ASC de primer paso (intermedios), cada criovial puede contener aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15 o aproximadamente 20 ml de suspensión de ASC, que corresponde a un número de ASC en el intervalo de 5 millones de células a 250 millones de células, tal como, por ejemplo, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente

45 50, aproximadamente 60, aproximadamente 80 o aproximadamente 100 millones de células. Preferentemente, los crioviales con ASC del primer paso contienen aproximadamente 50 millones de células en 5 ml.

Para las ASC del paso final, es decir, las ASC del 2º paso o superior, cada criovial puede contener aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15 o

50 aproximadamente 20 ml de suspensión de ASC, que corresponde a un número de ASC en el intervalo de 10 millones de células a 500 millones de células, tal como, por ejemplo, aproximadamente 40, aproximadamente 60, aproximadamente 80, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 160 o aproximadamente 200 millones de células. Preferentemente, los crioviales con ASC del segundo paso contienen de

55 aproximadamente 100 millones a aproximadamente 120 millones de células en aproximadamente 5 ml, tal como aproximadamente 110 millones de células en aproximadamente 5 ml. En las composiciones de la invención, a menos que el contexto lo contradiga, aproximadamente 110 millones de células incluyen de 100 millones a 120 millones de células.

60 La congelación se puede realizar ventajosamente mediante congelación automática con el uso de un congelador de velocidad controlada. Después de congelar, los viales se pueden transferir y almacenar a una temperatura en el intervalo de -70 °C a -196 °C, tal como entre -150 °C y -190 °C, tal como en el intervalo de -180 °C. Se conocen varios medios para congelar y mantener viales en dichas condiciones de congelación, muchos de los cuales implican nitrógeno líquido. Incluyen, por ejemplo, inmersión de los viales en nitrógeno líquido, almacenamiento de los viales en

65 la fase de vapor de nitrógeno líquido y colocación de los viales en el denominado almacenamiento en seco. En el último tipo de almacenamiento, los viales no están en contacto directo con nitrógeno en fase líquida o de vapor ya que

el nitrógeno está contenido en la cubierta del recipiente, lo que da como resultado una temperatura de almacenamiento en el intervalo de $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5 En un aspecto, se establece un sistema de banco de células de dos niveles para los viales, que constituye un banco de células en funcionamiento que contiene ASC intermedias de las expansiones de biorreactor del primer paso y un banco de productos celulares que contiene composiciones de ASC finalmente formuladas y empaquetadas. En el banco de células, las ASC intermedias del primer paso se criopreservan normalmente a aproximadamente 50 millones de células en aproximadamente 5 ml de CryoStor10 en crioviales hasta la carga para la segunda expansión del biorreactor. El producto de ASC final se criopreserva normalmente a aproximadamente 110 millones de células en aproximadamente 5 ml de CryoStor10 en crioviales hasta justo antes de su uso. Este producto también se puede designar "CSCC_ASC". En una realización, el banco de células comprende una pluralidad de viales almacenados en condiciones de congelación, comprendiendo cada vial aproximadamente 5 ml de las ASC del segundo paso, en donde la concentración de células es de 2×10^7 células por ml, por ejemplo, en el intervalo de $1,6 \times 10^7$ a $2,4 \times 10^7$ células por ml, o aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células por ml, por ejemplo, en el intervalo de $2,0 \times 10^7$ a $2,4 \times 10^7$ células por ml.

ASC:

20 Las ASC se caracterizan por su capacidad multipotente, perfil de marcador y/o por características funcionales de las ASC, tales como capacidad de proliferación, viabilidad, recuperación y capacidad inmunosupresora, incluso después de la criopreservación. Estas características de las ASC, detalladas a continuación, se aplican igualmente a las ASC obtenidas de acuerdo con el proceso de la invención. Los perfiles de marcadores pueden, por ejemplo, determinarse convenientemente mediante citometría de flujo usando anticuerpos marcados con fluorescencia contra cada marcador, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2, 10, 11 o 14.

25 Las ASC se caracterizan, en particular, por su capacidad para diferenciarse a lo largo de linajes adipocíticos, condroblásticos y osteoblásticos en condiciones apropiadas. Como se muestra en el Ejemplo 4, las ASC preparadas de acuerdo con los métodos de fabricación descritos en el Ejemplo 1 se diferenciaron en adipocitos, condrocitos y osteoblastos cuando se cultivaron en medio de diferenciación.

30 Las ASC se pueden también, o alternativamente, caracterizar de acuerdo con su fenotipo, es decir, el perfil del marcador, con respecto a su expresión de marcadores en común con otras células estromales/madre mesenquimatosas, incluyendo CD90, CD73, CD105 y CD44, y mantener niveles de expresión bajos o insignificantes de CD45 y CD31 (Bourin *et al.*, 2013).

35 En algunas realizaciones, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde al menos un 80 %, tal como al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 98 % de la población de células madre expresa CD105, CD90, CD73, CD29 y CD13, y como máximo un 10 %, tal como como máximo un 5 %, tal como como máximo un 3 %, tal como como máximo un 2 % expresa CD45, CD34, HLA-DR, CD19 y CD14. Preferentemente, al menos un 95 % expresa CD90, CD73 y CD13 y como máximo un 5 % expresa CD45, CD34, HLA-DR, CD19 y CD14.

45 En algunas realizaciones, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde al menos un 90 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166; como máximo un 5 % expresa CD45, CD19, CD14 y CD31; como máximo un 10 % expresa CD106; entre un 2 y un 15 % expresa CD36; al menos un 10 % expresa CD146; al menos un 80 % expresa CD105 y como máximo un 40 % expresa CD34. En algunas realizaciones, al menos un 95 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166. Además, al menos un 80 %, tal como al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 98 % puede expresar CD44.

50 En algunas realizaciones, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 % expresa CD105, CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166, tal como al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 95 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166; como máximo aproximadamente un 15 %, tal como como máximo aproximadamente un 10 % expresa CD45, CD19, CD14, CD106, CD31 y CD36, tal como como máximo aproximadamente un 7 %, tal como como máximo aproximadamente un 5 %, tal como como máximo aproximadamente un 3 % expresa CD45, CD19, CD14, CD106 y CD31; al menos aproximadamente un 2 %, tal como al menos aproximadamente un 5 %, tal como entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 20 %, tal como entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 15 % o entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 15 % expresa CD36; como máximo aproximadamente un 50 %, tal como como máximo aproximadamente un 40 %, tal como como máximo aproximadamente un 20 %, tal como como máximo aproximadamente un 10 % expresa CD34; y al menos aproximadamente un 10 %, tal como al menos aproximadamente un 12 % expresa CD146. En una realización, al menos un 95 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166; al menos un 85 % expresa CD105, como máximo un 2 % expresa CD45, HLA-DR, CD19, CD14 y CD31; entre un 2 % y un 15 % expresa CD36; y entre un 10 % y un 60 % expresa CD146. En una realización, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde los intervalos de los porcentajes de expresión mínimos y máximos de los marcadores son los que se muestran en la Tabla 20.

5 Cuando se determina inmediatamente después de la descongelación de las células del 2º paso criopreservadas, al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos un 85 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 98 % de las células son viables, según lo determinado por la exclusión de colorantes (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3). Preferentemente, al menos un 90 % de las células son viables.

10 En cuanto a la capacidad de proliferación, cuando se colocan en cultivo inmediatamente después de la descongelación, las ASC se caracterizan por una duplicación de la población (PD, por sus siglas en inglés) de al menos 1, tal como al menos 1,3, tal como al menos 1,5, tal como al menos 1,7, tal como al menos 2, cuando se cultivan en matraces de cultivo de tejidos durante 48 h (por ejemplo, de acuerdo con el método en el Ejemplo 3). Preferentemente, las ASC tienen una PD de al menos 1, tal como al menos 1,5. La PD se calcula como $\ln(N)/\ln 2$, donde N = Célula recolectada/Célula sembrada.

15 Como se muestra en los Ejemplos, las ASC se caracterizan además por sus propiedades inmunosupresoras. Por ejemplo, las ASC pueden caracterizarse por uno o más o todos los siguientes: supresión de la activación de células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés), supresión de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), marcadores de la superficie celular indicativos de inmunomodulación, especialmente inmunosupresión, o por un cambio en uno o más marcadores de la superficie celular en respuesta a una citocina tal como el interferón gamma.

20 En una realización, las ASC suprimen la activación de DC, por ejemplo, reduciendo la expresión de CD40, CD80, CD86 y HLA-DR mediante DC mezcladas con ASC en comparación con DC no mezcladas con ASC (es decir, un control positivo). En una realización específica, se usa el ensayo del Ejemplo 9, en donde se siembran ASC y DC para dar como resultado una relación de aproximadamente 1:1; las DC se estimulan con 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) y 20 ng/ml de interferón gamma y se incuban durante 24 h; y el nivel de expresión respectivo de CD40, CD80, CD86 y HLA-DR se reduce, en promedio, a como máximo un 80 %, 65 %, 70 % y 80 %, respectivamente, del control positivo.

30 En una realización, las ASC suprimen la proliferación de PBMC, por ejemplo, como se determina en una reacción de linfocitos mixtos (MLR, por sus siglas en inglés). Este tipo de ensayo es bien conocido en la técnica y puede comprender mezclar ASC con PBMC estimuladas de un donante alogénico en diferentes proporciones, por ejemplo, en el intervalo de 1:20 a 1:1, usando PBMC sin ASC como controles positivos, y midiendo, después de un período de cultivo conjunto de 4 días, la incorporación de PBMC de 3H-timidina (25 µSi/ml) durante un período de incubación de 18-20 h. Usando este tipo de ensayo, en comparación con el control positivo, una proporción 1:20, 1:10, 1:5 y 1:1 de ASC a PBMC puede dar como resultado una incorporación promedio de 3H-timidina de como máximo aproximadamente un 80 %, 75 %, 55 % y 25 %, respectivamente, del control positivo.

40 En algunas realizaciones, las ASC se caracterizan también o alternativamente por marcadores específicos indicativos de inmunomodulación, especialmente inmunosupresión, tales como CD10, CD140a, CD160, CD204, CD258, CD270, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G, LTβR y combinaciones de los mismos. Sin quedar limitado a ninguna teoría, estos marcadores están asociados a la señalización inmunitaria, la adhesión célula-célula y célula-ECM, la orientación, el reconocimiento de patrones, la inhibición de linfocitos T, el aumento de los receptores del factor de crecimiento y la inactivación de proteínas proinflamatorias.

45 En particular, en una realización, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 %, expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y/o LTβR, y, opcionalmente, HLA-ABC, tal como al menos aproximadamente un 90 % o en algunos casos al menos aproximadamente un 95 % o más expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LTβR. En algunas realizaciones, las ASC pueden caracterizarse además por expresar no más de aproximadamente un 20 %, tal como no más de aproximadamente un 15 %, o en algunos casos no más de aproximadamente un 10 %, de CD152, CD274 y/o CD86; y/o opcionalmente, al menos aproximadamente un 70 % de CD258, al menos aproximadamente un 55 % de CD270, al menos aproximadamente un 80 % de CD49a, hasta aproximadamente un 30 % de CXCR4 y/o entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 35 % de CD200. En algunas realizaciones, la población de ASC también puede ser una en donde, como máximo, aproximadamente un 15 % de las ASC expresan CD15, CD152, CD163, CD18, CD274, CD39, CD40, CD62L, CD80, CD86, y, opcionalmente HLA-DR, -DQ, -DP.

60 En una realización, una población sustancialmente homogénea de ASC es aquella en donde al menos un 90 % expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LTβR; al menos un 80 % expresa CD49a; al menos un 60 % expresa CD258 y CD270 y al menos un 5 % expresa CD200; como máximo un 15 % expresa CD15, CD152, CD163, CD18, CD274, CD39, CD40, CD62L, CD80 y CD86; y como máximo un 30 % expresa CXCR4.

65 En una realización, una población de ASC sustancialmente homogénea es aquella en donde al menos un 95 % de la población de ASC expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LTβR; al menos un 85 % expresa CD49a, al menos un 65 % expresa CD258 y CD270 y al menos un 10 % de la población expresa CD200, y como máximo un 15 % de la población expresa CD15, CD152, CD163, CD18, CD274,

CD39, CD40, CD62L, CD80, CD86, y HLA-DR, -DQ, y -DP, y como máximo un 25 % expresa CXCR4.

En una realización, las ASC se caracterizan además por menos de un 20 %, tal como menos de aproximadamente un 15 %, tal como menos de aproximadamente un 10 % de las ASC que expresan CD274. Opcionalmente, las ASC también se caracterizan por al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 95 %, tal como al menos aproximadamente un 98 % de las ASC que expresan CD54. En otra realización específica, las ASC se caracterizan por cada marcador en la Tabla 15 en el Ejemplo 10 a un porcentaje de población en el intervalo del valor mínimo al máximo mostrado en la Tabla 15.

Las ASC también pueden caracterizarse por sus porcentajes de expresión de marcadores de células estromales/madre de acuerdo con una realización en el presente documento y sus porcentajes de expresión de marcadores de inmunomodulación de acuerdo con una realización en el presente documento. Como un ejemplo no limitante, una población de ASC sustancialmente homogénea es aquella en donde

- al menos un 90 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166; como máximo un 5 % expresa CD45, CD19, CD14 y CD31; como máximo un 10 % expresa CD106; entre un 2 y un 15 % expresa CD36; al menos un 10 % expresa CD146; al menos un 80 % expresa CD105 y como máximo un 40 % expresa CD34; y
- al menos un 90 % expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LTβR; al menos un 80 % expresa CD49a; al menos un 60 % expresa CD258 y CD270 y al menos un 5 % expresa CD200; como máximo un 15 % expresa CD15, CD152, CD163, CD18, CD274, CD39, CD40, CD62L, CD80 y CD86; y como máximo un 30 % expresa CXCR4.

En una realización adicional, las ASC se caracterizan también o alternativamente por un cambio en uno o más marcadores de superficie celular en respuesta a una citocina proinflamatoria tal como interferón-gamma. Esto puede probarse ventajosamente de acuerdo con el ensayo del Ejemplo 11, normalmente midiendo un cambio en uno o más marcadores de ASC en las Tablas 16 y 17 que muestran

- un cambio positivo o negativo en el porcentaje de la población de ASC que expresa el marcador en al menos un 5 % de la población de ASC, o
- un cambio positivo o negativo en el nivel de expresión del marcador en la porción de células que expresan el marcador en al menos 0,5 veces,

cuando se cultiva durante 3 días en presencia de 50 ng/ml de IFN-gamma, en comparación con un control, tal como las células de las mismas ASC que no han sido estimuladas con IFN-gamma.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, tras la estimulación con IFN-gamma, se reducen los porcentajes de la población de ASC que expresa CD200, CD270, CD9, CXCR4; aumentan los porcentajes de la población de ASC que expresa CD274 y CD49a, y aumenta el nivel de expresión de CD54 en células positivas para CD54.

En algunas realizaciones, el cambio es uno o más o todos de

- el porcentaje de la población de ASC que expresa CD274, CD106 y/o CD49a aumenta en al menos un 5 %, tal como el porcentaje de CD274 aumenta en al menos un 40 %, como al menos un 60 %;
- el porcentaje de la población de ASC que expresa CD200, CD270, CD9 y/o CXCR4 se reduce en al menos un 5 %, tal como el porcentaje de la población de ASC que expresa se reduce en al menos un 10 %;
- el nivel de expresión de CD10, CD54, HLA-ABC y/o HLA-DR/DQ/DP aumenta en células positivas para marcadores, tal como el nivel de expresión de CD54 en células que expresan CD54 aumenta al menos 20 veces, tal como al menos 35 veces, tal como al menos 30 veces; y/o
- el nivel de expresión de LTβR disminuye, por ejemplo, al menos 2 veces.

En una realización específica, como máximo aproximadamente un 30 %, tal como como máximo aproximadamente un 20 %, tal como como máximo aproximadamente un 15 %, tal como como máximo aproximadamente un 10 % de la población de ASC expresa CD274, mientras que con la estimulación con interferón gamma, al menos un 70 %, tal como al menos aproximadamente un 80 %, tal como al menos aproximadamente un 85 %, tal como al menos aproximadamente un 90 %, tal como al menos aproximadamente un 95 % de la población de ASC expresa CD274, por ejemplo, cuando se cultivan las ASC durante 3 días en ausencia y presencia de 50 ng/ml de IFN-gamma, respectivamente.

También es notable un aumento en MFI de 3 a 97 para el marcador CD54 (ICAM-1) que ilustra la movilización de una molécula de adhesión intercelular necesaria para la estabilización de las interacciones ASC-leucocitos y la transducción de señales. ICAM-1 es un ligando para LFA-1 (integrina), un receptor que se encuentra en los leucocitos. Por tanto, en una realización, al menos un 95 % de la población de ASC expresa CD54 y, tras la estimulación con interferón gamma, el nivel de expresión de CD54 en las células que expresan CD54 aumenta al menos 20 veces, tal como al menos 30 veces.

En una realización particular, tras la estimulación con interferón gamma, el porcentaje de la población de ASC que

expresa CD274 se incrementa al menos un 80 % y el nivel de expresión de CD54 en células positivas para CD54 se incrementa al menos 25 veces.

Composiciones:

5 La presente invención también proporciona composiciones de cada población de ASC humana adulta sustancialmente homogénea e inmunosupresora detallada en los aspectos y realizaciones en el presente documento, incluyendo las de la sección "ASC" anterior y las obtenidas mediante cada proceso en la sección "Proceso", en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células por ml. Cada una de dichas poblaciones de ASC
10 también se habilitan en el formato de una composición de la invención.

En particular, se ha encontrado que las ASC, particularmente las ASC obtenidas de acuerdo con el proceso de la invención, se pueden crioconservar a altas concentraciones en un crioprotector libre de proteínas; al menos aproximadamente 1×10^7 células por ml, sin comprometer la viabilidad, capacidad de proliferación, propiedades
15 inmunosupresoras o recuperación. También se ha encontrado que el crioprotector basado en CryoStor puede proporcionar una mayor capacidad de proliferación que un crioprotector basado en seroalbúmina humana (HSA, por sus siglas en inglés).

En particular, las composiciones de la invención pueden comprender una suspensión de una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas, aislada del tejido adiposo recogido de un donante, en un crioprotector libre de proteínas, en donde la concentración celular es de al menos $1,5 \times 10^7$ células, tal como al
20 menos 2×10^7 células, tal como al menos 3×10^7 células, tal como al menos 5×10^7 células, por ml de crioprotector añadido. Preferentemente, la concentración celular es de al menos 2×10^7 células, tal como aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células por ml de crioprotector añadido.

Tal como se ha descrito anteriormente, el crioprotector libre de proteínas normalmente comprende de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de DMSO y Trolox, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , $\text{Mg}^{2+1}\text{Cl}^-$, H_2PO_4^- , HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión. Preferentemente, el crioprotector
25 comprende aproximadamente un 10 % de DMSO. También pueden usarse otros crioprotectores libres de proteínas conocidos en la técnica. Los ya descritos en la sección "Proceso" se contemplan particularmente.

También se habilitan las composiciones obtenidas cuando se descongelan las composiciones de ASC congeladas. Las composiciones de ASC congeladas pueden, por ejemplo, descongelarse en un baño de agua a 37°C o descongelarse/almacenarse a temperatura ambiente en la sala de operaciones. Se prefieren las composiciones donde,
35 inmediatamente después de la descongelación

- (a) al menos un 85 % de la población de ASC son células viables, y la viabilidad después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 2 horas es al menos de un 80 %;
- 40 (b) la población de ASC tiene una capacidad de proliferación que proporciona una PD de al menos 1 cuando se cultiva durante 48 horas;
- (c) la población de ASC es capaz de suprimir la maduración y activación de células dendríticas;
- (d) la recuperación después de la descongelación es superior a un 95 %, y la recuperación de las células después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 2 horas después de la descongelación es al menos de un 85 %
- 45 (e) la población de ASC tiene una adherencia celular *in vitro* tal que al menos un 60 %, tal como al menos un 65 %, tal como al menos un 70 % del número total de células son adherentes después de 5 horas en cultivo.

También se habilitan composiciones, donde, después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 2 horas después de la descongelación,

- 50 (a) al menos un 80 % de la población de células madre son células viables;
- (b) la población de células madre tiene una PD de al menos 1 cuando se cultiva durante 48 horas;
- (c) la población de células madre es capaz de suprimir la maduración y activación de células dendríticas;
- (d) la recuperación es al menos de un 85 %, y
- 55 (e) la población de ASC tiene una adherencia celular *in vitro* tal que al menos un 60 %, tal como al menos un 70 % del número total de células son adherentes después de 5 horas en cultivo.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Las composiciones de la invención son estériles y libres de endotoxinas y micoplasmas, los niveles de endotoxina se determinan normalmente con un método analítico que proporciona un nivel de detección mínimo de 10 EI por ml. Dado que las composiciones de la invención
60 están listas para uso clínico, las composiciones farmacéuticas normalmente comprenden solo las ASC y el crioprotector libre de proteínas. Sin embargo, también se contemplan componentes adicionales. De manera específica, la composición farmacéutica puede comprender además un biomaterial soluble o hidrogel que contiene biopolímeros naturales o sintéticos tales como proteínas, péptidos o mucopolisacáridos de matriz extracelular y/o alginato. Por
65 ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender alginato estéril y libre de endotoxinas (alginato de sodio VLVG, Novamatrix, FMC Biopolymers, Noruega), calcio parcialmente reticulado con ácido D-glucónico y sal de

hemicalcio (Follin *et al.*, 2015). En una realización, el alginato se mezcla con las ASC y el crioprotector hasta una concentración final de alginato parcialmente reticulado al 1 % (p/v) antes de la etapa final de crioconservación. En otra realización, el alginato parcialmente reticulado se almacena a TA y se mezcla con el producto final a una concentración final de alginato al 1 % (p/v), por ejemplo, mediante la inyección de la preparación de ASC en el recipiente de alginato antes de aspirar la suspensión final y conectar con el catéter de inyección.

También se habilitan jeringas u otros medios para inyección o infusión de las composiciones de ASC, que contienen las composiciones de ASC. Normalmente, la ampolla que contiene la composición de ASC se esteriliza con un algodón con alcohol (etanol al 82 % y clorhexidina al 0,5 %, Mediq, Dinamarca) y la suspensión celular se aspira con una aguja en una jeringa estéril. La jeringa se conecta luego a un catéter de inyección, por ejemplo, un catéter de inyección MYOSTAR (Biological Delivery System, Cordis, Johnson & Johnson, EE.UU.) para inyección. Se recomienda la inyección dentro de las 3 horas posteriores a la descongelación. Preferentemente, la jeringa u otros medios para inyección o infusión contienen aproximadamente 5 ml de la composición, que comprende de aproximadamente 100 millones a aproximadamente 120 millones de células, tal como aproximadamente 110 millones de ASC.

Uso terapéutico:

En una realización, se proporciona una composición de ASC de acuerdo con la invención para usar como medicamento, por ejemplo, para regeneración de tejidos, inmunosupresión y/o como fármaco antiinflamatorio.

De hecho, la invención proporciona diversos usos terapéuticos de las composiciones de ASC de la invención, que están "listas para usar" y listas para uso clínico. Debido a su alta concentración de ASC, al menos $1,5 \times 10^7$ células, preferentemente al menos 2×10^7 células, tales como aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células, por ml de crioprotector, las composiciones se pueden usar para aplicaciones donde un pequeño volumen de inyección es esencial así como para aplicaciones donde las composiciones de alta concentración se diluyen antes de la administración y se administran, por ejemplo, mediante infusión. Por otra parte, las ASC de varios donantes diferentes se pueden almacenar en un banco celular, lo que permite opciones de tratamiento repetidas y/o más versátiles.

Sin quedar limitado a ninguna teoría, después de la administración, las ASC estimulan y mejoran la regeneración a través de mecanismos paracrinos que liberan sustancias extracelulares que promueven mecanismos de reparación endógenos naturales, incluyendo la remodelación de la matriz, revascularización y modulación inmunitaria. Otra parte inherente de la modulación inmunitaria de ASC es la inmunosupresión activa que evita la inmunogenicidad y, por lo tanto, el rechazo del injerto alogénico de ASC. Esta puede ser una característica innata de ASC que distingue estas células de otras células somáticas.

Por tanto, en una realización, se habilita un producto terapéutico alogénico para usar en la regeneración de tejidos, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de un trastorno de tejido isquémico u otra disfunción de tejido o trastorno de destrucción. Ejemplos no limitantes de trastornos del tejido isquémico incluyen cardiopatía isquémica (con y sin insuficiencia cardíaca), infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, isquemia de la extremidad crítica, herida isquémica y lesión por reperfusión isquémica/disfunción de injerto de órgano primario. Los ejemplos no limitantes de trastornos de disfunción o de destrucción tisular incluyen reparación del disco intervertebral, miocardiopatía dilatada no isquémica y trastornos del cartílago articular. En algunas realizaciones, de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células en como máximo aproximadamente 5 ml de una composición de acuerdo con la invención se administran directamente al tejido isquémico. En una realización específica, de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células en como máximo aproximadamente 5 ml de una composición de acuerdo con la invención se administran mediante inyección intramiocárdica a un paciente con fracción de eyección (FE) ventricular izquierda reducida e insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, un producto CSCC_ASC que comprende aproximadamente 110 millones de células en 5 ml de crioprotector se puede descongelar y administrar en como máximo 1, como máximo 2 o como máximo 3 horas mediante inyección intramiocárdica directa en un paciente con FE ventricular izquierda reducida e insuficiencia cardíaca. En otra realización específica, de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células en como máximo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml de una composición de acuerdo con la invención se administran mediante inyección directa en una articulación de un paciente, por ejemplo, que padece un trastorno de cartílago articular.

En una realización, se habilita un producto terapéutico alogénico para usar como inmunosupresor, por ejemplo, para tratar o evitar una enfermedad o trastorno autoinmunitario o rechazo de trasplante. Ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos autoinmunitarios incluyen la enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedad renal, artritis reumática y rechazo de un órgano trasplantado, incluyendo, pero sin limitación, trasplantes de médula ósea, corazón, pulmón y riñón. En una realización específica, se pueden administrar de aproximadamente 10×10^6 a aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por ml en aproximadamente 200 ml de líquido de infusión estéril de una composición de acuerdo con la invención mediante inyección intravenosa o intraarterial o mediante infusión a un paciente, por ejemplo, un paciente que padece la enfermedad de Crohn.

En una realización, se habilita un producto terapéutico alogénico para usar en el tratamiento o prevención de la inflamación, es decir, como un fármaco antiinflamatorio. Ejemplos no limitantes de trastornos inflamatorios incluyen diabetes tipo 2, enfermedad renal, miocardiopatía dilatada no isquémica, hipertensión arteriopulmonar y sepsis. En

una realización específica, se pueden administrar de aproximadamente 10×10^6 a aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por ml en aproximadamente 200 ml de líquido de infusión estéril de una composición de acuerdo con la invención mediante inyección intravenosa o intraarterial o mediante infusión a un paciente, por ejemplo, un paciente que padece hipertensión arteriopulmonar.

5 Por ejemplo, un producto CSCC_ASC se puede descongelar, opcionalmente diluido en de 5 a aproximadamente 200 ml de líquido de infusión estéril a una concentración de aproximadamente 10×10^6 a aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por ml, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 millones de células por ml; y administrar en como máximo 1, como máximo 2 o como máximo 3 horas mediante inyección o infusión en un paciente que padece o está en riesgo
10 de un trastorno autoinmunitario o inflamatorio o rechazo de trasplante. Como alternativa, un producto CSCC_ASC se puede descongelar y diluir en un líquido estéril a una concentración de aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 millones de células por ml, y administrarse mediante inyección intravenosa o intraarterial o infusión, o administrarse directamente en un tejido enfermo.

15 En algunas realizaciones, múltiples composiciones de ASC de acuerdo con la invención pueden proporcionar un tratamiento personalizado, por ejemplo, permitiendo el emparejamiento de tejidos entre el donante y el receptor antes del tratamiento, varios tratamientos del receptor y, en caso de que el receptor necesite varios tratamientos, la posibilidad de cambiar ASC de un donante a otro. Esto último es particularmente útil en caso de que el receptor haya desarrollado una respuesta de aloanticuerpos a ASC a partir de una preparación de ASC administrada anteriormente,
20 en cuyo caso puede no ser posible continuar usando ASC del mismo donante. De manera específica, un banco celular con ASC de múltiples donantes permite el emparejamiento de tejido receptor-donante, lo que puede mejorar la eficacia clínica.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes Ejemplos, que no pretenden ser limitantes.

25

Ejemplo 1

Fabricación de producto de ASC

30 Se ha utilizado el siguiente procedimiento:

Aislamiento de la fracción vascular del estroma:

35 El lipoaspirado se obtiene de donantes sanos. La elegibilidad del donante se determina basándose en una entrevista con el donante, un cuestionario y pruebas para detectar marcadores de enfermedades infecciosas VIH, hepatitis B y C, sífilis y HTLV. La liposucción de grasa abdominal subcutánea se realiza con anestesia local y proporciona aproximadamente de 100 ml a 300 ml de lipoaspirado de cada donante. Se coloca anestesia local en la piel abdominal, en 2-4 lugares para la posterior conexión de la liposucción. A través de estos agujeros, se introduce la cánula de infusión (aguja delgada) mientras se inyecta líquido, por ejemplo, anestésicos y reactivos para relajar el tejido graso,
40 tal como un tampón de lactato, bicarbonato sódico, adrenalina y lidocaína. Se utiliza Bodyjet EVO (liposucción asistida por agua) (Human med, Alemania). El lipoaspirado se retira a través de la cánula de succión Bodyjet y dentro de la cámara de recolección estéril. El lipoaspirado se transfiere a un matraz/botella estéril con una jeringa estéril.

45 La fracción vascular estromal se aísla del lipoaspirado mediante digestión enzimática del tejido adiposo antes de la expansión del cultivo en biorreactores. El lipoaspirado se lava dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 para eliminar la sangre residual. El tejido adiposo se digiere mediante incubación con 0,6 PZ U/ml de colagenasa NB6 (Serva GmbH, Alemania) disuelto en HBSS (+ CaCl_2 + MgCl_2) (Gibco, Life Technologies) diluido a una concentración de Ca^{2+} 2 mM a 37 °C durante 45 minutos en rotación constante. La colagenasa se neutraliza con medio que contiene 5 % de lisado de plaquetas humano y 1 % de penicilina/estreptomina y se filtra a través de un filtro de 100 μm (Steriflip, Millipore). Las células restantes se centrifugan a 1200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se resuspenden y se cuentan usando un NucleoCounter® NC-100TM de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Expansión del primer paso:

55 Aproximadamente 100 millones de células de la SVF se cargan en un biorreactor (Sistema cuántico de expansión celular, Terumo, Bélgica) para la expansión de ASC. El biorreactor cuántico es un sistema funcionalmente cerrado que consiste en un biorreactor de fibra hueca desechable encerrado en una incubadora independiente. Se alimenta a través de dos circuitos de circulación con entradas para medios y reactivos o células. Los desechos se eliminan en una bolsa de desechos.
60

65 Todo el proceso está informatizado y controlado por una interfaz de pantalla táctil, lo que permite el control de la tasa de perfusión media, el tiempo de recolección, los lavados de medios y otras tareas asociadas al crecimiento de las ASC. Con la excepción del llenado de bolsas de entrada con crioprecipitado; la adición de enzimas para el desprendimiento de células; o la transferencia de células recolectadas de la bolsa de recolección a la bolsa de entrada de células (todo lo cual se hace antes de cargarlo en el biorreactor), todos los procedimientos asociados al biorreactor

se cierran o protegen mediante un filtro de barrera estéril de 0,2 mm.

De cuatro a 24 horas antes de cargar la SVF en un biorreactor, el sistema se ceba con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y posteriormente se carga con aproximadamente 30 ml de crioprecipitado (Banco de sangre, Rigshospitalet, Dinamarca) para el recubrimiento del biorreactor. El crioprecipitado se usa tal cual o se diluye, por ejemplo, en 1:3 o 1:4, tal como hasta un total de 100 ml, con PBS. Antes de cargar las células, la PBS y el crioprecipitado se lavan del sistema y se reemplazan con medio completo (Medio esencial mínimo, MEM alfa (αMEM) sin ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos, (Gibco, Life Technologies), penicilina/estreptomicina al 1 % (Gibco, Life Technologies), lisado de plaquetas humanas al 5 % (Stemulate, Cook General Biotechnology). Se proporciona gas al sistema como un suministro mezclado previamente de O₂ al 20 %, CO₂ al 5 % y equilibrado con N₂ (Strandmøllen, Dinamarca).

Se transfieren 100 millones de SVF diluidas en 100 ml de medio completo a una bolsa de entrada de células usando una jeringa de 60 ml y se cargan en el biorreactor cuántico. Se permite que las células se adhieran durante 24 h, después de lo cual se activa la alimentación continua con medios. La velocidad de alimentación del medio comienza a 0,1 ml/min. Según las mediciones de glucosa y lactato, se ajusta la velocidad de alimentación y se identifica la expansión de las células. Los niveles de glucosa y lactato se controlan mediante la retirada de muestras del puerto de muestra del biorreactor cuántico y la toma de medidas en un analizador de gases en sangre ABL 835 FLEX (Radiometer, Dinamarca). Aproximadamente 9 días después de la carga de células, las ASC se recolectan mediante la carga de un TrypLE® Select (Gibco, Life Technologies) en el sistema. El proceso de recolección incluye un lavado del sistema con PBS, la adición de 180 ml de TrypLE® Select y 20 minutos de incubación. Las células recolectadas se lavan en la bolsa de recolección celular. Las células de la bolsa de recolección se transfieren a tubos de centrifuga en flujo de aire laminar, se lavan, se granulan y se cuentan y se prueba su viabilidad con un NucleoCounter.

Las ASC intermedias del primer paso se granulan y se resuspenden en CryoStor10 (BioLifeSolutions) en una concentración de 10 millones de células por ml. Esta solución se divide en alícuotas en viales criogénicos CellSeal (Cook General Biotechnology) en un volumen total de 5 ml por vial.

Los viales criogénicos se congelan luego en un congelador de velocidad controlada (Kryo 560-16, Planer) para alcanzar -80 °C y se transfieren en hielo seco a un congelador de nitrógeno líquido isotérmico de almacenamiento en seco de nitrógeno líquido (V1500-AB, CBS) que proporciona temperaturas uniformes en el intervalo de -180 °C, sin nitrógeno líquido en el espacio de almacenamiento de la muestra. Este sistema minimiza el riesgo de contaminación cruzada.

Los productos intermedios de primer paso crioconservados constituyen el banco de células de trabajo y se almacenan hasta la carga para la segunda expansión en el biorreactor.

Expansión del segundo paso

De cuatro a 24 horas antes de la carga de las ASC intermedias del primer paso para la expansión del segundo paso, se ceba y reviste un nuevo biorreactor como se describe para la expansión del primer paso. El sistema se carga con medio completo y se proporciona gas al sistema como un suministro mezclado previamente de O₂ al 20 %, CO₂ al 5 % y equilibrado con N₂. Se retira un vial CellSeal que contiene 50 millones de ASC del primer paso del tanque de nitrógeno. La ampolla de células se transfiere a una "bolsa con cierre" y se descongela en un baño de agua a 37 °C. El sello del fondo del vial se retira y se desinfecta con alcohol. Se corta un trozo de tubo del respiradero, para evitar demasiada presión sobre las células. Con una jeringa de 10 ml y una aguja de 16G, se extrae una cantidad predeterminada de células (por ejemplo, 1 cuarto de la ampolla, 1 mitad de la ampolla o la ampolla completa) y se transfiere a un tubo de centrifuga de 10 ml. Las células se cuentan y la viabilidad se determina con un NucleoCounter. Las células se diluyen con 100 ml de medio completo y se transfieren a la entrada de células usando una jeringa de 60 ml. La expansión y la recolección se realizan como se describe para la expansión del primer paso.

Después de aproximadamente 7 días de expansión del segundo paso, se recolectan las ASC, se sedimentan y se resuspenden las células en CryoStor10 a una concentración de aproximadamente 22 millones de células por ml, normalmente en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 24 millones de células por ml. Esta solución se divide en alícuotas en crioviales CellSeal en un volumen total de 5 ml por vial, que contiene aproximadamente 110 millones de células por vial, normalmente en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 120 millones de células por vial.

Los crioviales se congelan luego en un congelador de velocidad controlada para alcanzar -80 °C y se transfieren en hielo seco a un recipiente de almacenamiento en seco de nitrógeno líquido que proporciona temperaturas uniformes en el intervalo de -180 °C, sin nitrógeno líquido en el espacio de almacenamiento de la muestra. Las ASC del segundo paso crioalmacenadas constituyen el medicamento en investigación CSCC_ASC y se almacenan en el banco de células del producto hasta su envío para uso clínico.

El producto está listo para usar y solo requiere un manejo mínimo junto al paciente. Un vial congelado se descongela en un baño de agua a 37 °C en/cerca de la sala de operaciones. El vial se esteriliza (normalmente con un algodón con

alcohol) y la suspensión celular se aspira con una aguja en una jeringa estéril. La jeringa se conecta luego al catéter de inyección y se administra al paciente.

Ejemplo 2

5

Caracterización de marcadores de superficie celular del producto de ASC

Se usó inmunofenotipado para identificar la calidad celular y se realizó en el producto intermedio del primer paso y el producto final del segundo paso antes y después de la crioconservación para el producto de ASC preparado de acuerdo con el Ejemplo 1.

10

Las células recolectadas se lavaron, filtraron y distribuyeron a tubos con o sin anticuerpos. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos que se muestran en la Tabla 1. Después de la incubación, las células se lavaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS para citometría de flujo usando un protocolo de seis colores.

15

De acuerdo con la Farmacopea Europea, la citometría de flujo es un método adecuado para la identificación de marcadores de superficie celular. Los anticuerpos marcados con fluorescencia contra los marcadores de superficie recomendados por ISCT/IFATS (Federación Internacional de Terapéutica y Ciencia Adiposas y la Sociedad Internacional de Terapia Celular) para la identificación de ASC se añadieron a las ASC y se midió la fluorescencia asociada a las células usando un citómetro de flujo. Para la caracterización de un producto dado, se utiliza un protocolo compensado de 6 colores que marca células con fluoróforos ficoeritrina, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina-Texas Red, ficoeritrina-cianina y alofococianina. La viabilidad se determinó mediante tinción SYTOX azul. El protocolo se desarrolló con compensación manual, controles isotópicos y controles Fluorescence Minus One. Las células muertas y los dobletes se excluyeron del análisis final. Los datos se recogieron y analizaron usando un Navios compatible con GMP (Beckman Coulter, Alemania). Los datos se analizaron usando el programa informático Navios y Kaluza (Beckman Coulter, Alemania).

20

25

TABLA 1

<i>Marcadores de superficie en ASC intermedias del primer paso de 5 donantes diferentes.</i>						
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Media de 5 donantes
Marcadores de superficie primarios (porcentaje de población total)						
Viabilidad	96	92	98	98	97	96
CD45	1	1	1	1	0	1
CD34	13	4	5	8	0	6
CD105	100	100	100	100	100	100
CD90	100	100	100	100	100	100
CD73	100	100	100	99	100	100
CD13	99	100	100	100	100	100
HLA-DR	3	1	4	2	1	2
CD19	1	0	0	0	0	0
CD14	1	0	3	0	1	1
Marcadores de superficie secundarios (porcentaje de población total)						
CD29	100	100	100	100	99	100
CD166	99	100	100	99	100	100
CD146	30	15	34	43	81	41
CD106	3	1	4	2	2	2
CD31	2	2	3	2	0	2
CD36	14	10	17	8	12	12

30

TABLA 2

<i>Marcadores de superficie en ASC finales del segundo paso de 3 donantes diferentes antes de la crioconservación</i>				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Media de 3 donantes
Marcadores de superficie primarios (porcentaje de población total)				
Viabilidad	96	97	98	97
CD45	0	1	1	1

(continuación)

<i>Marcadores de superficie en ASC finales del segundo paso de 3 donantes diferentes antes de la crioconservación</i>				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Media de 3 donantes
CD34	1	0	1	1
CD105	100	100	100	100
CD90	100	100	100	100
CD73	100	100	100	100
CD13	100	100	100	100
HLA-DR	0	1	3	1
CD19	0	0	0	0
Marcadores de superficie primarios (porcentaje de población total)				
CD14	0	0	0	0
Marcadores de superficie secundarios (porcentaje de población total)				
CD29	100	100	100	100
CD166	100	100	100	100
CD146	25	15	23	21
CD106	1	1	1	1
CD31	1	1	1	1
CD36	3	3	8	5

TABLA 3

<i>Marcadores de superficie en ASC finales del segundo paso de 3 donantes diferentes directamente después de la crioconservación</i>				
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Media de 3 donantes
Marcadores de superficie primarios (porcentaje de población total)				
Viabilidad	95	96	95	95
CD45	0	0	0	0
CD34	1	0	0	0
CD105	100	100	100	100
CD90	100	100	100	100
CD73	100	100	100	100
CD13	100	100	100	100
HLA-DR	0	0	0	0
CD19	0	0	0	0
CD14	0	0	0	0
Marcadores de superficie secundarios (porcentaje de población total)				
CD29	100	100	100	100
CD166	100	100	100	100
CD146	29	40		51
CD106	0	0	0	0
CD31	0	0	0	0
CD36	3	3	3	3

Ejemplo 3

5

Caracterización del producto de ASC - viabilidad celular

La calidad del producto y el efecto del producto final están sujetos a la viabilidad de las ASC. Por lo tanto, la viabilidad es significativa en todo el proceso de fabricación.

10

La viabilidad se determinó varias veces durante el proceso de producción del Ejemplo 1; la viabilidad de SVF se determinó antes de cargarla en el biorreactor para la primera expansión; la viabilidad de ASC expandida del primer paso se determinó después de la recolección y después de descongelar y cargar en el segundo paso; la viabilidad del producto final se determinó después de la recolección y después de la crioconservación y descongelación. El

porcentaje de viabilidad se determinó con un NucleoCounter® NC-100™. El Nucleo-Counter es un citómetro de imagen basado en la detección de fluorescencia del colorante fluorescente de unión al ADN, yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés).

5

TABLA 4

<i>Viabilidad de SVF y ASC durante el proceso de fabricación</i>	
<i>Etapas de producción</i>	<i>Viabilidad (%)</i>
SVF (n = 3)	86 ± 3
ASC del primer paso después de la recolección (n = 3)	89 ± 2
ASC del primer paso después de la criopreservación (n = 10)	90 ± 2
ASC del segundo paso después de la recolección (n = 10)	90 ± 3
ASC del segundo paso después de la criopreservación (n = 2)	91 ± 2

Ejemplo 4

Ensayos de diferenciación

10

La capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de las ASC del segundo paso expandidas con Stemulate como complemento de crecimiento en biorreactores cuánticos se determinó utilizando el kit de diferenciación StemPro (Gibco, Life Technology), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

15

Para la diferenciación osteogénica, se incubaron 10.000 ASC/pocillo en placas de 12 pocillos en medio de inducción osteogénica (medio basal de diferenciación de osteocitos/condrocitos StemPro, complemento de osteogénesis StemPro, penicilina/estreptomicina). Para la diferenciación adipogénica, se incubaron 20.000 ASC/pocillo en placas de 12 pocillos en medio de inducción adipogénica (medio basal de diferenciación de adipocitos StemPro, complemento de adipocitos StemPro, penicilina/estreptomicina). Para la diferenciación condrogénica, se incubaron múltiples gotas de 5 µl de 80.000 ASC en medio de inducción condrogénica (medio basal de diferenciación de osteocitos/condrocitos StemPro, complemento de condrogénesis StemPro, penicilina/estreptomicina). Las células se indujeron durante 21 días, con el medio cambiado cada 3-4 días. Las células de control se incubaron con medio completo sin complemento hasta confluencia.

25

La diferenciación osteogénica se documentó ya que las células mostraron depósitos de calcio con tinción Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). La diferenciación adipogénica se documentó a través de la apariencia morfológica de las gotas de grasa teñidas con Oil Red O (Sigma-Aldrich). La diferenciación condrogénica se documentó a medida que las células se tiñeron con Alcian Blue 8GX (Sigma-Aldrich). Las células de control mantenidas en medios completos fueron todas negativas.

30

Ejemplo 5

Comparación de formulaciones crioprotectoras

35

La viabilidad y la función de las ASC en el producto criopreservado final al descongelarse junto al paciente es de importancia primordial para la eficacia del producto. La viabilidad y la función se determinaron para ASC criopreservadas con el uso de diferentes formulaciones crioprotectoras.

40

Los productos de ASC intermedias del primer paso y los productos de ASC finales del segundo paso se fabricaron como se describe en el Ejemplo 1. Las ASC intermedias se congelaron en diferentes formulaciones crioprotectoras a 50×10^6 células por 5 ml en viales criogénicos.

45

Las ASC finales del segundo paso se congelaron en diferentes formulaciones criogénicas a 100×10^6 células por 5 ml en viales criogénicos. Las células se congelaron en un congelador automático a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se almacenaron en almacenamiento de nitrógeno líquido en seco y se descongelaron en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; la viabilidad y la recuperación se determinaron inmediatamente después de descongelar y hasta 3 horas después de descongelar mientras se mantenían en formulación criogénica a temperatura ambiente.

50

Inmediatamente después de la descongelación y hasta 3 horas después de la descongelación, mientras se mantuvo en formulación criogénica a temperatura ambiente, el producto celular ASC final se lavó y se puso en cultivo para la identificación de la función celular según lo determinado por la morfología, adherencia y proliferación *in vitro*. Los cultivos se establecieron con 1×10^6 células por matraz T75 con 20 ml de medio completo, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, CO_2 al 5 %.

55

La viabilidad y la recuperación se determinaron con un Nucleocounter. La morfología y la adhesión se determinaron mediante microscopía 24 h después de que las células se pusieron en cultivo. La proliferación se determinó mediante desprendimiento y recuento de células con un Nucleocounter 48 horas después de que se pusieron en cultivo.

Se analizaron las crioformulaciones que contenían 5 % o 10 % de HPL o albúmina humana (HA, por sus siglas en

inglés) y DMSO en solución salina isotónica, CryoStor10 y CryoStor5.

TABLA 5

<i>Recuperación y viabilidad inmediatamente después de descongelar las ASC intermedias del primer paso (50 x 10⁶ células/5 ml) en diferentes formulaciones criogénicas</i>			
50 x 10 ⁶ N=3	HA al 10 %	HA al 5 %	CryoStor10
aproximadamente 97 % de recuperación	97 %	96 %	94 %
aproximadamente 97 % de viabilidad	93 %	90 %	90 %

5

TABLA 6

<i>Recuperación y viabilidad inmediatamente después de descongelar las ASC finales del segundo paso (100 x 10⁶ células/5 ml) en diferentes formulaciones criogénicas.</i>				
100 x 10 ⁶ (N = 1)		HA al 10 %	HA al 5 %	CryoStor10
Inmediatamente después de la descongelación	% de recuperación, 0 horas	107 %	104 %	108 %
	aproximadamente 97 % de viabilidad, 0 horas	91 %	92 %	91 %
3 horas después de la descongelación	aproximadamente 97 % de recuperación, 3 horas	106 %	105 %	95 %
	aproximadamente 97 % de viabilidad, 3 horas	87 %	87 %	82 %

TABLA 7

<i>Viabilidad y recuperación de las células del producto final de ASC del segundo paso (100 x 10⁶ ASC/5 ml). Tres donantes diferentes crioconservados en CryoStor10. La viabilidad y la recuperación se midieron inmediatamente después de descongelar (0 horas) y 1, 2 y 3 horas después de descongelar y almacenar en formulación crioprotectora a TA.</i>									
% de viabilidad	0 horas	1 horas	2 horas	3 horas	aproximadamente 97 % de recuperación	0 horas	1 horas	2 horas	3 horas
Donante 1	91 %			82 %	D1	108 %			95 %
Donante 2	88 %	84 %	82 %	82 %	D2	100 %	90 %	85 %	92 %
Donante 3	90 %	87 %	85 %	83 %	D3	99 %	106 %	105 %	113 %
Promedio	90 %	86 %	84 %	82 %	Promedio	102 %	98 %	95 %	100 %

10

La función y la potencia de las células son los mejores indicadores de eficacia clínica. Con los métodos *in vitro* disponibles actualmente, la morfología, adhesión y proliferación son los mejores indicadores generales de la función celular. El examen microscópico reveló que la función celular (morfología, adhesión y proliferación) era superior para las células formuladas en CryoStor10.

TABLA 8

<i>Proliferación de ASC intermedias del primer paso congeladas en diferentes formulaciones crioprotectoras. Se colocaron 1 x 10⁶ células en cultivo inmediatamente después de la descongelación y se determinó la proliferación después de 48 horas (n = 3).</i>			
50 x 10 ⁶	HA al 10 %	HA al 5 %	CryoStor10
Número de células:	4,94 x 10 ⁵	6,49 x 10 ⁵	1,61 x 10 ⁶

15

TABLA 9

<i>Proliferación de ASC finales del segundo paso congeladas en diferentes formulaciones criogénicas. Se colocaron 1 x 10⁶ células en cultivo inmediatamente después de la descongelación y se determinó la proliferación después de 48 horas (n = 1).</i>			
100 x 10 ⁶	HA al 10 %	HA al 5 %	CryoStor10
Número de células 0 horas	1,17 x 10 ⁶	7,96 x 10 ⁵	1,73 x 10 ⁶
Número de células 3 horas	3,65 x 10 ⁵	2,11 x 10 ⁵	7,05 x 10 ⁵

TABLA 10

Proliferación de las células del producto final de ASC del segundo paso (100 x 10⁶ ASC/5 ml). Las ASC de tres donantes diferentes criopreservadas en CryoStor10. La proliferación medida con células puestas en cultivo inmediatamente después de la descongelación (0 horas) y 1, 2 y 3 horas después de la descongelación y almacenamiento en formulación criogénica a TA. Se colocaron 1 x 10⁶ ASC en matraces T75 y se contaron después de 48 horas.

	0 horas	1 horas	2 horas	3 horas
Donante 1	1,73 x 10 ⁶			7,05 x 10 ⁵
Donante 2	2,72 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁶	1,92 x 10 ⁶	1,49 x 10 ⁶
Donante 3	3,59 x 10 ⁶	2,14 x 10 ⁶	2,08 x 10 ⁶	1,89 x 10 ⁶
Promedio	2,68 x 10 ⁶	2,15 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁶	1,36 x 10 ⁶

Ejemplo 6

5 *Comparación de complementos de crecimiento*

Se aisló la SVF de lipoaspirado obtenido de tres donantes femeninas sanas (edad entre 32-47 años; edad media 40 años) como se describe en el ejemplo 1. La SVF se cultivó en cuatro medios diferentes compatibles con GMP que contenían hPL al 5 % o FBS al 10 %. Las ASC P0, P1 y P5 se caracterizaron y utilizaron para el análisis.

10 Se establecieron cultivos celulares primarios de ASC sembrando 4,5 x 10⁶ SVF/matraces T75 en medio completo que contenía Medio Esencial Mínimo, MEM Alfa (aMEM), Penicilina/Estreptomina al 1 % y con cuatro complementos de crecimiento diferentes:

- 15
1. Lisado de plaquetas humanas al 5 % (PLTMax, Mill Creek Life Sciences), 10 UI de heparina
 2. Lisado de plaquetas humanas al 5 % (Stemulate, hPL-S, COOK General Biotechnology), 10 UI de heparina
 3. Lisado de plaquetas humanas al 5 % (Stemulate, hPL-SP, COOK General Biotechnology)
 4. Suero fetal bovino al 10 % (FBS, Gibco, Life Technologies)

20 El HPL se compone de plasma con fibrinógeno y otros factores de coagulación, por lo tanto, se debe añadir heparina para evitar la gelatinización. COOK General Biotechnology produce el lisado de plaquetas humanas agrupado StemulateTM en dos versiones diferentes, PL-S que requiere heparina y PL-SP que no requiere heparina, donde se han eliminado algunos de los factores de coagulación y no se requiere la adición de heparina.

25 Las células se incubaron en condiciones convencionales a 37 °C en aire húmedo con CO₂ al 5 %. El medio de ASC se cambió después de 2 días para descartar células no adherentes, y posteriormente cada 3-4 días. Cuando el cultivo alcanzó un nivel de confluencia de aproximadamente un 90 %, las células se lavaron con PBS, se separaron y se pasaron para configuraciones experimentales. La proliferación se determinó los días 1, 2, 3, 5 y 7 mediante recuento manual en una cámara Bürker-Türk. Las duplicaciones de población (PD) se calcularon como PD = ln (N/N0)/ln 2, donde N es el número de células recolectadas en el día 7 y N0 es el número de células sembradas. La capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de las ASC se determinó usando el kit de diferenciación StemPro. La inmunofenotipificación se determinó como se describe en el Ejemplo 2. La estabilidad genómica se determinó mediante hibridación genómica comparativa.

35 TABLA 11

Proliferación de ASC en medios con diferentes complementos de crecimiento.

N = 3	SVF sembrada	ASC P0 recolectada	Media de días en cultivo	ASC: Relación SVF	ASC P0 sembrada	ASC P1 recolectada	Media de días en cultivo	PD
	4,5E+06	6,8E+06 ± 3,7E+05	7 ± 0	1,51	3,5E+05	5,0E+06 ± 5,1E+05	7 ± 0	3,8
	4,5E+06	6,6E+06 ± 1,1E+06	7 ± 0	1,47	3,5E+05	4,6E+06 ± 7,4E+05	7 ± 0	3,7
	4,5E+06	5,2E+06 ± 8,1E+05	7 ± 0	1,16	3,5E+05	4,1E+06 ± 3,4E+05	7 ± 0	3,5
	4,5E+06	5,1E+06 ± 1,1E+06	7 ± 0	1,13	3,5E+05	1,3E+06 ± 3,7E+05	23 ± 2,2	1,9

Como se ilustra en la Tabla 11, el uso de un producto de HPL es claramente un complemento de crecimiento más eficaz en términos de capacidad proliferativa que el uso de FBS.

40 Las ASC cultivadas con todos los complementos de crecimiento probados en el paso uno demostraron tener perfiles

inmunofenotípicos comparables y característicos de ASC y mantuvieron su capacidad de diferenciación de tres linajes. La estabilidad genómica identificada por la Hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) muestra que las ASC expandidas *in vitro*, en presencia de PLTMax, Stemulate y FBS no mostraron ningún reordenamiento cromosómico desequilibrado cuando se cultivaron hasta un quinto paso. Por lo tanto, la mayor capacidad proliferativa de las ASC cultivadas en PLTMax o Stemulate no comprometió estabilidad genómica.

Ejemplo 7

Comparación de expansión manual y automatizada en biorreactores

La SVF se aisló de la grasa abdominal, se suspendió en medio basal complementado con penicilina/estreptomicina y un complemento de crecimiento que contenía suero y se sembró en matraces T75 o en un biorreactor cuántico que había sido recubierto con crioprecipitado. El cultivo de ASC pasados de SVF se realizó a través de tres métodos: matraz a matraz; matraz a biorreactor; y biorreactor a biorreactor. En todos los casos, los controles de calidad se realizaron mediante pruebas de esterilidad, micoplasma y endotoxina, además de la evaluación de recuentos de células, viabilidad e inmunofenotipo según lo determinado mediante citometría de flujo.

Los cultivos primarios en matraz se establecieron mediante la siembra de $4,5 \times 10^6$ células SVF por matraz T75 incubado en condiciones estándar a 37 °C, CO2 al 5 %. El medio de cultivo se cambió después de 3 días eliminando las células no adherentes. Posteriormente, el medio se cambió cada 3-4 días durante el resto del cultivo. Alcanzando un nivel de confluencia de 90 %, se recolectaron células. Las células se volvieron a sembrar a $3,5 \times 10^5$ células/matraz T75. La viabilidad y el rendimiento de las ASC en el paso 0 (P0) y el paso 1 (P1) se determinaron con un NucleoCounter® NC-100TM y se calcularon como medias de tres matraces T75.

Para la expansión primaria de SVF en el biorreactor cuántico, el sistema se cebó y se recubrió con crioprecipitado como se describe en el ejemplo 1. Se cargaron 100×10^6 células de SVF y se dejaron unir durante 24 horas, antes de que la alimentación a 0,1 ml/min comenzara automáticamente. Después de 3 días de cultivo, se realizó una tarea de lavado para eliminar las células no adherentes. Para la expansión del segundo paso de ASC cultivadas previamente (es decir, las resultantes de la expansión primaria), el biorreactor cuántico se sembró con 30×10^6 ASC. La expansión de SVF y ASC realizada en el biorreactor cuántico utilizó medios y reactivos que eran idénticos a los utilizados para el cultivo en matraz.

TABLA 12

<i>Comparación del rendimiento de SVF y ASC en cultivo manual en matraz y expansión automática en biorreactor</i>						
N = 3	SVF sembrada ± DE	SVF sembrada por cm2	Media de días en cultivo ± DE	ASC recolectadas del primer paso ± DE	Viabilidad	ASC: Relación SVF
Cuántico	$5,56 \times 10^7 \pm 1,76 \times 10^7$	$2,66 \times 10^3$	15 ± 9	$8,98 \times 10^7 \pm 4,88 \times 10^7$	96 %	1,7
Matraces	$4,50 \times 10^6 \pm 0$	$6,00 \times 10^4$	9 ± 2	$1,75 \times 10^6 \pm 1,08 \times 10^6$	97 %	0,4
N = 3	ASC sembrada para segunda expansión ± DE	ASC sembrada por cm2	Media de días en cultivo	ASC recolectadas del segundo paso ± DE	Viabilidad	PD
Q-Q	$2,10 \times 10^7 \pm 0$	$1,00 \times 10^3$	18 ± 6	$9,53 \times 10^7 \pm 5,77 \times 10^6$	96 %	2,13
M-M	$3,50 \times 10^5 \pm 0$	$4,67 \times 10^3$	17 ± 6	$7,53 \times 10^5 \pm 7,71 \times 10^4$	98 %	1,08
M-Q	$2,10 \times 10^7 \pm 0$	$1,00 \times 10^3$	17 ± 6	$9,91 \times 10^7 \pm 1,28 \times 10^7$	97 %	2,23

La viabilidad de las ASC P0 y P1 fue superior a un 96 %, independientemente del cultivo en matraz o biorreactor. Las ASC expandidas en todas las condiciones demostraron tener perfiles inmunofenotípicos comparables y característicos de ASC. Las pruebas de esterilidad, micoplasma y endotoxina fueron consistentemente negativas.

Sin embargo, un promedio de 55×10^6 células SVF cargadas en un biorreactor produjo 89×10^6 ASC P0 (1,6 veces más ASC en relación con el número de células SVF sembradas), mientras que $4,5 \times 10^6$ SVF sembradas por matraz T75 produjo un promedio de $1,75 \times 10^6$ ASC (0,4 veces el número de ASC en relación con el número de células SVF sembradas). Las ASC P1 expandidas en el biorreactor cuántico demostraron una duplicación de la población (PD) alrededor de 2,1 independientemente de si P0 se cultivó en matraces o en el biorreactor cuántico, mientras que las ASC P1 en matraces solo alcanzaron una PD de 1,0.

En conclusión, la fabricación de ASC en un biorreactor mejora la tasa y el rendimiento de expansión de ASC significativamente en relación con el procesamiento manual en matraces en T, al tiempo que mantiene la pureza y la calidad esenciales para la producción celular segura y consistente.

Ejemplo 8*Comparación de complementos de crecimiento en biorreactores cuánticos*

Se comparó el uso de HPL (Stemulate, hPL-SP, libre de heparina, COOK General Biotechnology) y suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Life Technology) como complementos de crecimiento para la expansión de ASC en un biorreactor cuántico.

A partir de lipoaspiraciones de tres donantes, se realizó el aislamiento de SVF de la grasa abdominal y la expansión del primer paso de acuerdo con el Ejemplo 1. De estos pasos, 30×10^6 ASC se volvieron a cargar en un nuevo biorreactor cuántico para una segunda expansión. En todos los pasos, el control metabólico (glucosa y lactato) guió la velocidad de alimentación y el tiempo de recolección. Se determinaron la viabilidad, esterilidad, pureza, capacidad de diferenciación y estabilidad genómica de las ASC. Se realizaron controles de calidad microbiana, citometría de flujo, triple diferenciación y estabilidad genómica según lo determinado por ensayos de matriz de hibridación genómica comparativa.

Cada paso de este proceso de dos pasos demostró que HPL apoyó la proliferación de ASC en mayor medida que FBS. Como un promedio de 3 donantes, el cultivo de SVF en medios HPL durante 9 (7-11) días produjo un promedio de 546×10^6 ASC. El cultivo de la SVF en medios FBS requirió 8 días más para producir 111×10^6 ASC. Las ASC del segundo paso produjeron en promedio 800×10^6 células (PD 5,2) después de 6 días en medios hPL en comparación con 100×10^6 (PD: 2,2) células en medios FBS después de 21 días. Las ASC cumplieron los criterios de ISCT en ambos tipos de medios (inmunofenotipo y triple diferenciación). La hibridación genómica comparativa demostró estabilidad genómica. Las pruebas de esterilidad, micoplasma y endotoxina fueron todas negativas.

La combinación del uso de biorreactores cuánticos y hPL, recuperó 5 veces más ASC de primer paso y 8 veces más ASC de segundo paso en comparación con el uso de biorreactores cuánticos y FBS.

Ejemplo 9*Actividad inmunosupresora del producto de ASC final*

Un manifiesto durante el daño tisular de cualquier origen, ya sea isquémico, traumático o autoinmunitario por naturaleza, es la aparición rápida de células inflamatorias, que disminuye lentamente durante el proceso exitoso de regeneración pero persiste durante la cicatrización crónica de heridas isquémicas/traumáticas y la reacción autoinmunitaria. Este infiltrado consiste en una acumulación inicial de monocitos/macrófagos seguida de linfocitos. Como tal, la inmunosupresión ejercida por un producto de ASC sobre todo en la población de monocitos/macrófagos se espera que cambie el equilibrio a favor de la regeneración. La actividad inmunosupresora de ASC también es imprescindible para la supervivencia del aloinjerto y, por lo tanto, una multitud de mecanismos regenerativos.

Como la inmunosupresión es una característica de ASC inherente de interés tanto para el uso alogénico como para la eficacia, se utilizaron modelos celulares *in vitro* que abordan la inmunidad innata y celular, tales como ensayos de células dendríticas humanas y reacciones de linfocitos mixtos humanos para examinar la actividad inmunosupresora.

Los cultivos conjuntos con ASC y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) procedentes de monocitos circulantes se establecieron de acuerdo con el método de Jensen y Gad (2010). Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron de capas leucocíticas de donantes sanos menores de 50 años, mediante centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare) y aislamiento de la interfaz celular. Las células se lavaron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma) con pen/estrep al 1 %, y los monocitos CD14+ se aislaron mediante selección positiva usando una columna de separación MACS y perlas magnéticas (microperlas CD14 MACS, humanas, Miltenyi Biotec). La columna se lavó con tampón PBSE desgasificado (PBS, EDTA 0,5 mol/l, FBS al 2), antes y después de aplicar la suspensión celular. Se sembraron monocitos CD14+ en placas de seis pocillos a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 con pen/estrep al 1 %, suero AB humano al 2 %, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos recombinantes humanos (20 ng/ml) e interleucina humana (IL)-4 (20 ng/ml; PeproTech). El medio se cambió cada 2-3 días. Después de 6 días de diferenciación, las células se recolectaron y se prepararon para el cultivo conjunto DC:ASC. El producto celular CSCC_ASC; el segundo paso de ASC crioconservadas (en CryoStor10) se descongeló y las células se colocaron en un matraz de cultivo (aMEM, Stemulate al 5 %, pen/estrep al 1 %) durante una semana antes de iniciar el cultivo conjunto de DC:ASC (ASC rehabilitadas en cultivo). El día del cultivo conjunto de DC:ASC, un vial de producto celular CSCC_ASC; las ASC crioconservadas del segundo paso (en CryoStor10) se descongeló para uso directo en cultivos conjuntos. Las ASC se sembraron en una placa de 48 pocillos en una concentración de 1×10^6 por pocillo, lo que dio como resultado una relación de DC a ASC de 1:1. Las DC se activaron mediante estimulación con $1 \mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido (LPS; Sigma) y 20 ng/ml de interferón gamma (IFN-g; Peprotech). Como control positivo para la activación de DC, un pocillo que contenía DC solo fue igualmente estimulado con $1 \mu\text{g/ml}$ de lipopolisacárido (LPS; Sigma) y 20 ng/ml de interferón gamma (IFN-g; Peprotech) y se incubó durante 24 horas.

Citometría de flujo de marcadores de maduración de células dendríticas

Los cultivos conjuntos se recolectaron mediante la resuspensión y eliminación del sobrenadante y el raspado del fondo

de los pocillos con una punta de pipeta doblada. Las células recolectadas se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS (PBS complementado con NaN₃ al 1,5 % y FBS al 1 % inactivado por calor). Las muestras se incubaron con IgG humana (Sigma) en hielo durante 15 minutos para bloquear los receptores Fc. Los anticuerpos primarios utilizados fueron IgG-APC, CD11c-APC, IgG1k-PE, CD40-PE, CD80-PE, CD86-PE (BD Bioscience) y HLA-DR-FITC (Beckman Coulter). Las muestras se incubaron con anticuerpos durante 30 minutos en hielo y se lavaron, y los datos se obtuvieron en un FACS Accuri (BD Bioscience). Los datos se adquirieron en acontecimientos controlados como la población de DC mediante positividad y tamaño de CD11c y analizados en Flowlogic. Se midió la intensidad fluorescente media (MFI, por sus siglas en inglés) y se comparó con la MFI de las DC de control positivo.

TABLA 13

Marcador	CD40	CD80	CD86	HLA-dr
Tratamiento	Expresión en porcentaje de DC estimuladas ± DE N = 5			
DC no estimulada (control)	66 ± 21	16 ± 6	65 ± 31	71 ± 27
DC estimulada (control positivo)	100	100	100	100
DC estimulada cultivada conjuntamente con ASC directamente a partir del crioinmagenamiento	78 ± 17	59 ± 9	65 ± 24	78 ± 20
DC estimulada cultivada conjuntamente con cultivo de ASC rehabilitadas	67 ± 18	42 ± 8	50 ± 21	60 ± 33

Los ensayos con células dendríticas humanas mostraron que el producto de ASC final del segundo paso y criofórmula suprimió la maduración/activación de las células dendríticas humanas. Esto designó que el producto celular era activamente inmunosupresor y escaparía al rechazo después de la inyección *in vivo*. Se realizaron experimentos con el producto final directamente después de descongelar y con ASC del producto final y descongelado que se había puesto en cultivo para rehabilitar. Por lo tanto se había abordado la influencia de la formulación de ASC y el almacenamiento criogénico con respecto a la activación de las células dendríticas.

La actividad inmunosupresora del producto de ASC final del segundo paso se examinó adicionalmente en un modelo celular *in vitro* basado en una reacción mixta de linfocitos (MLR, por sus siglas en inglés). En este modelo, las células mononucleares de sangre periférica circulante (PBMC, por sus siglas en inglés) se estimularon mediante PBMC irradiadas de un donante alógeno y se añadieron diferentes proporciones de producto de ASC final. En resumen, las ASC se cultivaron en placas de 96 pocillos en proporciones correspondientes a de 1:20 a 1:1 de las siguientes PBMC de respuesta. Los pocillos sin ASC (solo medio) se usaron como controles positivos. El día después, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purificaron a partir de las capas leucocíticas mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Lymphoprep. La mitad de cada grupo de PBMC se irradió con una fuente de radiación gamma (3000 RAD). Las PBMC se combinaron en placas de 96 pocillos (100 µl + 100 µl por pocillo) para hacer una serie de MLR únicas; los grupos proliferativos de PBMC se estimularon mediante grupos irradiados de otros donantes. Después de un período de cultivo conjunto de 4 días, se añadió 3H-timidina (25 µSi/ml) y se incubó durante 18-20 horas. Usando una cosechadora automatizada, las células se recolectaron en placas de filtro, se pusieron en líquido de centelleo y se determinaron los recuentos por minuto, visualizando las respuestas proliferativas de PBMC, con un contador de centelleo (Topcount).

La adición del producto final de ASC del segundo paso a MLR demostró que las ASC ejercen efectos supresores sobre la rápida proliferación de linfocitos que normalmente ocurre.

TABLA 14

DATOS MLR	MLR con dosis crecientes de ASC del segundo paso, comenzando con 1 ASC por 20 ⁶ PBMC de respuesta.		
	Datos normalizados a MLR sin ASC presentes. N = 5 donantes de ASC		
Proporción	Media	Error estándar de la media	N reacciones MLR
Sin ASC	100 %	0	30
ASC 1:20	75 %	0,09	30
ASC 1:10	72 %	0,07	30
ASC 1:5	53 %	0,09	30
ASC 1:1	21 %	0,05	30

Ejemplo 10

Fenotipado inmunomodulador del producto final/ASC del segundo paso

La caracterización fenotípica del producto final CSCC_ASC, preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, basada en marcadores de superficie inmunomoduladores se realizó mediante citometría de flujo. Las ASC se recolectaron con TrypleSelect, se lavaron, se filtraron y se distribuyeron a tubos con o sin anticuerpos. Las células se incubaron durante

30 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos que se muestran en la Tabla 15. Después de la incubación, las células se lavaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS para citometría de flujo.

Se usó un protocolo de color único que marca las células con anticuerpos conjugados con fluoróforos como ficoeritrina, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina-Texas Red, ficoeritrina-cianina, aloficocianina y Violeta Brillante (polímeros conductores). La viabilidad se determinó mediante tinción con FVS-780 (Becton Dickinson). Las células muertas y los dobletes se excluyeron del análisis final. Los datos se recolectaron y analizaron usando un Navios compatible con GMP (Beckman Coulter, Alemania). Los datos se analizaron usando el programa informático Navios y Kaluza (Beckman Coulter, Alemania).

TABLA 15

Marcador	Porcentaje mínimo de expresión de la población N = 3	Porcentaje máximo de expresión de la población N = 3
CD10	99	100
CD140b	99	100
CD15	0	3
CD152	0	9
CD160	99	100
CD163	0	2
CD18	0	1
CD200	10	28
CD204	99	100
CD258	80	100
CD270	65	90
CD272	99	100
CD274	2	13
CD39	0	1
CD40	0	1
CD44	99	100
CD49a	88	100
CD54	98	100
CD62L	0	1
CD80	0	1
CD86	0	7
CD9	94	100
CXCR4	1	20
Galectina 3	99	100
Galectina 9	99	100
HLA-ABC	99	100
HLA-DR, DQ, DP	0	1
HLA-G	99	100
LTβR	99	100
CXCR4: Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4		
LTβR: Receptor de linfotóxina beta		

Todos los marcadores de CD que se muestran en la Tabla 15 se han elegido por su relevancia en las funciones inmunomoduladoras y especialmente inmunosupresoras. La caracterización de ASC como se muestra en la Tabla 15 está de acuerdo con un considerable potencial inmunosupresor (Krampera *et al.*, 2013). Especialmente los fuertes marcadores positivos CD10, CD140a, CD160, CD204, CD258, CD270, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3 y Galectina 9, HLA-G y LTβR reflejan capacidades inmunomoduladoras de ASC a través de mecanismos como la señalización inmunitaria, la adhesión célula-célula y célula-ECM, la orientación, el reconocimiento de patrones, la inhibición de linfocitos T, el aumento de los receptores del factor de crecimiento y la inactivación de proteínas proinflamatorias.

Ejemplo 11

Capacidades funcionales inmunomoduladoras; adaptaciones fenotípicas al ambiente proinflamatorio

Para examinar si el fenotipo inmunomodulador e inmunosupresor ilustrado en el Ejemplo 10 cumple con la capacidad de respuesta inmunosupresora real, las ASC del producto CSCC_ASC, preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, se expusieron con una citocina proinflamatoria *in vitro* y se examinaron los cambios fenotípicos.

Los ASC del producto final de diferentes donantes se cultivaron *in vitro* en medio estándar (αMEM, Pen/Estrep, hPL

al 5 %). A aproximadamente un 80 % de confluencia, la mitad de los cultivos de cada donante se estimularon con 50 ng/ml de IFN-gamma, 25 ml de medio por cultivo. Después de 3 días, los cultivos se recolectaron con TrypleSelect y se prepararon para citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 10.

TABLA 16

Marcador	ASC no estimuladas		ASC estimuladas con IFN-γ	
	Porcentaje mínimo de expresión de la población N = 3	Porcentaje máximo de expresión de la población N = 3	Porcentaje mínimo de expresión de la población N = 3	Porcentaje máximo de expresión de la población N = 3
CD10	99	100	99	100
CD140b	99	100	99	100
CD15	0	3	0	1
CD152	0	9	1	8
CD160	99	100	99	100
CD163	0	2	0	1
CD18	0	1	0	1
CD200	10	28	12	20
CD204	99	100	99	100
CD258	80	100	86	90
CD270	65	90	52	88
CD272	99	100	93	99
CD274	2	13	89	99
CD39	0	1	0	1
CD40	0	1	3	15
CD44	99	100	99	100
CD49a	88	100	99	100
CD54	98	100	99	100
CD62L	0	1	0	1
CD80	0	1	0	1
CD86	0	7	1	4
CD9	94	100	86	94
CXCR4	1	20	1	3
Galectina 3	99	100	98	100
Galectina 9	99	100	99	100
HLA-ABC	99	100	99	100
HLA-DR, DQ, DP	0	1	90	93
HLA-G	99	100	99	100
LTβR	99	100	3	5

TABLA 17

Marcador	Porcentaje de la media de población (n = 3)			Media de la intensidad de fluorescencia media (MFI) (n = 3)			
	ASC no estimulada	ASC estimulada con IFN-γ	Δ %	ASC no estimulada	ASC estimulada con IFN-γ	Δ MFI	Cambio en veces de MFI
CD10	100	100	0	28	43	15	1,5
CD140b	100	99	-1	13	10	-3	0,8
CD15	2	1	-1	1	2	1	2
CD152	4	3	-1	2	3	1	1,5
CD160	100	100	0	4	4	0	1
CD163	1	1	-1	1	3	2	3
CD18	0	1	0	4	4	0	1
CD200	19	13	-7	1	2	1	2
CD204	100	100	0	4	4	0	1
CD258	90	88	-3	4	3	-1	0,8
CD270	78	70	-8	3	3	0	1
CD272	99	96	-4	5	4	-2	0,8
CD274	8	94	87	2	3	1	1,5
CD39	0	1	0	3	3	1	1

(continuación)

Marcador	Porcentaje de la media de población (n = 3)			Media de la intensidad de fluorescencia media (MFI) (n = 3)			
	ASC no estimulada	ASC estimulada con IFN- γ	Δ %	ASC no estimulada	ASC estimulada con IFN- γ	Δ MFI	Cambio en veces de MFI
CD40	0	8	8	3	2	-1	0,7
CD44	100	100	0	61	63	2	1
CD49a	93	100	6	3	8	5	2,7
CD54	99	100	1	3	97	94	32
CD62L	0	0	0	2	5	3	2,5
CD80	0	1	0	3	4	0	1,3
CD86	4	2	-2	2	2	1	1
CD9	96	89	-7	7	4	-3	0,6
CXCR4	8	2	-6	2	2	1	1
Galectina 3	100	99	-1	6	5	-1	0,8
Galectina 9	100	100	0	4	3	0	0,8
HLA-ABC	100	100	0	14	181	167	13
HLA-DR, DQ, DP	0	92	91	6	24	18	4
HLA-G	100	100	0	4	5	1	1,25
LT β R	100	100	0	9	4	-5	0,5

Como se muestra en la Tabla 16 y 17, las ASC del producto final son capaces de responder a un ambiente inflamatorio. Las respuestas se encuentran a nivel de población, así como a nivel celular individual.

- 5 Porcentaje de población significa el porcentaje de células en toda la población que muestra el marcador de superficie mencionado. Los números de la intensidad de fluorescencia media corresponden al aumento o descenso del número de marcadores en cada célula individual.

- 10 De particular importancia es que un aumento del 87 % de CD274 (PD-L1) basándose en la población ilustra la capacidad de iniciar acciones inmunosupresoras. CD274, conocido por su expresión en macrófagos, juega un papel importante en la supresión del sistema inmunitario durante acontecimientos particulares tales como aloinjertos de tejidos y enfermedades autoinmunitarias (Camillieri et al, 2016; Krampera et al., 2013). PD-L1 se une a su receptor, PD-1, que se encuentra en linfocitos T activados, linfocitos B y células mieloides, y modula la activación o inhibe la proliferación de linfocitos T. PD-L1 actúa al menos en parte a través de la inducción de apoptosis. El papel preciso de CD274 en la ASC del segundo paso aún no se ha determinado, pero las MSC de médula ósea positivas para CD274, expandidas manualmente con FBS, regulan la proliferación de linfocitos T y la polarización de Th17, y han demostrado efectos comparables en las licencias de IFN γ .

- 20 También es notable un aumento en MFI de 3 a 97 para el marcador CD54 (ICAM-1) que ilustra la movilización de una molécula de adhesión intercelular necesaria para la estabilización de las interacciones ASC-leucocitos y la transducción de señales. ICAM-1 es un ligando para LFA-1 (integrina), un receptor que se encuentra en los leucocitos.

- 25 Se espera un aumento significativo de HLA DR/DP/DQ, pero en el contexto de una falta de aumento de los marcadores coestimuladores conocidos CD40, CD80 y CD86, no se obtiene un fenotipo presentador de antígeno. Por el contrario, el aumento significativo simultáneo de CD274 y la expresión persistente de otros marcadores inmunosupresores es consistente con que la producción neta sea antiinflamatoria (Krampera et al., 2013; Galipeau et al., 2016)

- 30 La capacidad de responder fenotípicamente y funcionalmente al ambiente es crítica para la capacidad de los productos de interactuar con el ambiente *in vivo* en el que se inyectan células durante el tratamiento. Este rasgo interactivo inherente del producto es significativo por sus características y su eficacia clínica. La capacidad de asumir un fenotipo inmunosupresor permite y explica el uso alogénico.

Ejemplo 12

- 35 *Estudio clínico*

- 40 10 pacientes de $62,5 \pm 6,6$ años de edad (media \pm DE) con cardiopatía isquémica crónica e insuficiencia cardíaca, insuficiencia ventricular izquierda reducida (≤ 45 %), insuficiencia cardíaca de Nueva York (NYHA, por sus siglas en inglés) clase II-III, sin más opciones de revascularización y en terapia médica máxima tolerable se han tratado con el producto final CSCC_ASC. Con un catéter NOGA Myostar® (Biological Delivery System, Cordis, Johnson & Johnson, EE.UU.), se inyectaron aproximadamente 15 inyecciones de 0,3 ml de CSCC_ASC preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1 en miocardio viable en la zona fronteriza del área infartada.

Los pacientes se sometieron a ecocardiografía y tomografía computarizada con contraste al inicio del estudio y después de seis meses.

5 Se utilizó un escáner CT de 320 detectores múltiples (Aquilion One, Toshiba Medical Systems Corporation, Otawara, Japón) para realizar una tomografía computarizada cardíaca. El intervalo R-R y la reconstrucción de imágenes multisegmentarias se realizaron con el programa informático del escáner. Las imágenes se reconstruyeron con un grosor de corte de 0,5 mm e incrementos de 0,25 mm en un intervalo del 2 % en la ventana prospectiva.

10 La ecocardiografía midió la función cardíaca y los volúmenes en vistas paraesternal y apical.

Todos los datos de imágenes se analizaron con la herramienta de procesamiento posterior de cvi (Imágenes cardiovasculares circulares, Calgary, Alberta, Canadá). Los bordes endocárdico y epicárdico se rastrearán manualmente en la diástole final y la sístole final y el plano mitral se estableció para definir el borde basal del VI.

15 Se utilizó la Clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA). Se colocan a los pacientes en una de las cuatro categorías en función de cuánto están limitados durante la actividad física con respecto a la dificultad para respirar.

20 La prueba de caminata de 6 minutos (6MWT, por sus siglas en inglés) se estandarizó de acuerdo con las pautas de la American Thoracic Society de marzo de 2002 utilizando un pasillo o corredor de 30 m de largo (100 pies). Las escalas Borg CR10 se utilizaron para medir la intensidad de la experiencia.

TABLA 18

Eficacia clínica						Intervalo de confianza al 95 %		p
	Número de pacientes	Base antes del tratamiento	6 meses después del tratamiento	Diferencia	DE	Inferior	Superior	
LVEF	9	28,8 %	31,7 %	2,9 %	4,1	0,2	6,1	0,065 ^a
LVESV	9	205 ml	182 ml	23 ml	34	-3	49	0,073 ^a
6MWT	8	460 m	495 m	35 m	14	24	47	< 0,0001
NYHA	10	2,8	2,2	0,6	0,8	0	1,2	0,063 ^b

a: prueba t pareada
b: prueba de rangos con signo de Wilcoxon

25 Seis meses después del tratamiento, se mejoró la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF, por sus siglas en inglés) y 6MWT, mientras que el volumen telesistólico ventricular izquierdo (LVESV, por sus siglas en inglés) y la puntuación de la NYHA disminuyeron. Las medidas revelan una mejor función de bombeo del corazón, mayor capacidad de trabajo y menos ataques de falta de respiración. El tratamiento fue seguro y eficaz.

30 **Ejemplo 13**

Adherencia superficial de ASC

35 Una característica inherente que define una población de ASC es la capacidad de adhesión de las ASC. Además, la capacidad de adherirse es el primero de muchos rasgos que demuestran que las ASC han mantenido la función celular normal. En este ejemplo, se estudió la capacidad de adherirse a los ASC del producto CSCC_ASC, producido como se describe en el Ejemplo 1 después del almacenamiento en recipientes de nitrógeno líquido de almacenamiento en seco a -180 °C durante un máximo de 12 meses. En resumen, las ASC de tres donantes, preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1, se almacenaron durante 1, 3, 6 y 12 meses, se descongelaron, se contaron y se colocaron en cultivo *in vitro*, 1 millón de células viables por matraz en aMEM con HPL al 5 % durante 5 horas. Después de 5 horas, se lavaron los cultivos y se separó la población adherente con TrypleSelect y se contó.

TABLA 19 A, B y C

Tabla 19 a: Porcentaje de ASC unidas después de 5 horas <i>in vitro</i> en comparación con el número sembrado (1 millón de células viables congeladas y descongeladas de CSCC_ASC sembradas)				
Donante/Meses de almacenamiento	1	3	6	12
BO03				77 %
PE04	80 %		76 %	
LA09	84 %	92 %	74 %	

(continuación)

Tabla 19 b: Viabilidad de ASC en viales CSCC ASC antes de la siembra				
Donante/Meses de almacenamiento	1	3	6	12
BO03				93 %
PE04	95 %		93 %	
LA09	92 %	97 %	96 %	

Tabla 19 c: Porcentaje de ASC en viales capaces de adherirse dentro de las 5 horas <i>in vitro</i>				
Donante/Meses de almacenamiento	1	3	6	12
BO03				72 %
PE04	76 %		71 %	
LA09	77 %	89 %	71 %	

La capacidad de adherirse a una superficie es una característica importante de ASC. El producto CSCC_ASC presenta un alto grado de adhesividad de ASC mantenida después de congelar, almacenar y descongelar.

- 5 Si se almacena en recipientes de almacenamiento en seco de N₂ a -180 °C durante un máximo de 12 meses, entre el 71 y el 89 % (media: 76 %) de las células mantienen la capacidad funcional de adherirse.

Ejemplo 14

10 Marcadores de superficie

Las células producidas como se describe en el Ejemplo 1 se caracterizaron como se describe en el Ejemplo 2, excepto por el uso de un protocolo de citometría de flujo de un solo color, produciendo los resultados que se muestran en la Tabla 20 a continuación para ASC del primer paso (8 lotes) y ASC del segundo paso (14 lotes).

- 15 En resumen, las células se analizaron directamente después de la recolección y antes de la crioconservación. Para la citometría de flujo, las células se lavaron con PBS, se ajustaron a 1 millón de células por ml y se marcaron con la tinción de viabilidad FVS-780 (Becton Dickinson) durante 10 minutos a TA en oscuridad. El FVS-780 se lavó con PBS que contenía FBS, la suspensión celular se filtró y los anticuerpos se añadieron durante 30 minutos a TA en oscuridad y en volúmenes de acuerdo con la valoración previa. Todos los anticuerpos utilizados fueron de Becton Dickinson y se conjugaron con fluorocromos PE (Ficoeritrina), Violeta brillante 510, FITC (isotiocianato de fluoresceína), APC (Alofocianina) y PerCp-Cy5.5 (tándem de peridina y clorofila). Las células muertas y los dobletes se excluyeron del análisis final. Los datos se recogieron y analizaron usando un Navios compatible con GMP (Beckman Coulter, Alemania). Los datos se analizaron usando el programa informático Navios y Kaluza (Beckman Coulter, Alemania).

25

TABLA 20

Marcador	Porcentaje de población de ASC Primer paso n = 8 lotes			Porcentaje de población de ASC Segundo paso n = 14 lotes		
	Media	Mínimo	Máximo	Media	Mínimo	Máximo
Viabilidad	93,6	84,5	97,5	95,6	90,3	98,4
CD45	0,9	0,3	2,7	0,2	0,1	0,4
HLA-DR	0,4	0,2	0,8	0,1	0,0	0,2
CD14	1,1	0,2	2,9	0,3	0,1	1,3
CD31	1,0	0,3	1,6	0,2	0,1	0,6
CD34	8,0	3,0	15,8	9,5	0,1	34,5
CD36	15,6	9,7	27,2	6,9	3,5	11,3
CD106	4,6	0,4	9,8	2,1	0,1	7,4
CD146	32,4	9,1	52,7	31,0	12,3	52,0
CD13	99,3	99,2	99,7	99,7	99,2	100,0
CD29	96,7	95,0	98,3	97,1	93,1	99,8
CD73	99,1	99,0	99,6	99,8	99,6	100,0
CD90	98,8	95,8	99,7	99,5	96,9	99,9
CD105	97,7	95,9	99,5	96,5	88,5	99,9
CD166	97,8	97,1	99,5	99,7	99,1	100,0

La Tabla 20 muestra los porcentajes de ASC después del primer y segundo paso que expresan marcadores de superficie con nombre utilizados para la caracterización de ASC. Los valores medios de expresión se basan en 8 y 14

lotes para el primer paso y el segundo paso, respectivamente. También se muestran los niveles de expresión mínimo y máximo.

LISTA DE REFERENCIAS

- 5 Bourin P, et al. *Cytotherapy*. Junio de 2013; 15 (6): 641-648.
Camilleri et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2016) 7:107
Dominici M, et al. *Cytotherapy* (2006) Vol. 8, N.º 4, 313-317.
Ekblond A. Presentation at the International Congress on Adipose Stem Cell Treatments 2015 (iCAST2015).
- 10 Follin B, et al. *Cytotherapy*. Agosto de 2015;17(8):1104-18).
Gebler A, et al. *Trends in Molecular Medicine* 18.2 (2012): 128-134.
Jensen SS y Gad M. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:37.
Krampera et al., *Cytotherapy*, 2013; 15:1054-1061
Mathiasen AB, et al. *Am Heart J*. 2012 164(3):285-91.
- 15 Mathiasen AB, et al. *Int J Cardiol*. 2013 170(2):246-51.
Qayyum AA, et al. *Regen Med*. 2012 7(3):421-8.
Wang Y, et al. *Nature Immunology* 15.11 (2014): 1009-1016.
Documento WO 2014/203267 A2 (Kaziak Research PVT Ltd.)
Documento WO 2006/037649 A1 (Cellerix S.L. y Universidad Autónoma de Madrid)
- 20 Documento WO 00/02572 A1 (Baust J.G.)
Documento WO 2010/064054 A1 (Reneuron Ltd.)

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una suspensión de una población sustancialmente homogénea e inmunosupresora de células madre procedentes de tejido adiposo (ASC) humanas adultas en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células por ml.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde al menos aproximadamente un 80 % de la población de ASC expresa CD90, CD73, CD13, CD105, CD29, CD166, CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD49a, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LT β R y como máximo aproximadamente un 15 % de la población de ASC expresa CD45, CD19, CD14, CD106, CD31 y CD36.
3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, de la población de ASC, al menos un 90 % expresa CD90, CD73, CD13, CD29 y CD166; como máximo un 5 % expresa CD45, CD19, CD14 y CD31; como máximo un 10 % expresa CD106; entre un 2 y un 15 % expresa CD36; al menos un 10 % expresa CD146; al menos un 80 % expresa CD105 y como máximo un 40 % expresa CD34; y/o al menos un 90 % expresa CD10, CD140b, CD160, CD204, CD272, CD44, CD54, CD9, Galectina 3, Galectina 9, HLA-G y LT β R; al menos un 80 % expresa CD49a; al menos un 60 % expresa CD258 y CD270 y al menos un 5 % expresa CD200; como máximo un 15 % expresa CD15, CD152, CD163, CD18, CD274, CD39, CD40, CD62L, CD80 y CD86; y como máximo un 30 % expresa CXCR4.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, tras la estimulación con interferón gamma que comprende el cultivo durante 3 días en presencia de 50 ng/ml de interferón gamma, el porcentaje de la población de ASC que expresa CD274 aumenta al menos un 80 % y el nivel de expresión de CD54 en células positivas para CD54 aumenta al menos 25 veces en comparación con una población de ASC de control cultivada durante 3 días en ausencia de interferón gamma.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, inmediatamente después de la descongelación, al menos un 80 % de la población de células madre son células viables, y la población de células madre tiene una duplicación de la población de al menos 1 cuando se cultiva durante 48 horas.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el crioprotector comprende Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺Cl⁻, H₂PO₄⁻, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión, y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de DMSO.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de ASC está entre 2×10^7 células y 5×10^7 células por ml.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es una composición farmacéutica.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está congelada.
10. Un banco de células que comprende una pluralidad de viales almacenados en condiciones de congelación, comprendiendo cada vial una composición de acuerdo con la reivindicación 9.
11. El banco de células de la reivindicación 10, en donde cada vial comprende aproximadamente 5 ml de la composición, y en donde la concentración celular está en el intervalo de aproximadamente $2,0 \times 10^7$ a aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células por ml.
12. Un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas, que comprende las etapas de
- (i) añadir la fracción vascular estromal (SVF) de un lipoaspirado recogido de un donante a un biorreactor en donde al menos una superficie se trata previamente para promover la adhesión de células madre humanas adultas;
 - (ii) en el biorreactor, cultivar células adherentes para confluencia en un medio de cultivo libre de suero complementado con lisado de plaquetas humanas;
 - (iii) separar las células adherentes;
 - (iv) congelar las células separadas en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos 1×10^6 células/ml;
 - (v) descongelar las células congeladas y repetir las etapas (ii) y (iii), y opcionalmente (iv), al menos una vez,
 - (vi) congelar las células separadas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células/ml; y
 - (vii) opcionalmente, descongelar la composición congelada.
13. El proceso de la reivindicación 12, en donde

- a) al menos una superficie del biorreactor se trata previamente con una composición que comprende o que consiste en crioprecipitado;
- b) el medio de cultivo comprende de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 15 % de lisado de plaquetas humanas;
- 5 c) el crioprotector comprende de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de DMSO y Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺Cl⁻, H₂PO₄⁻, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión;
- d) en la etapa (v), la descongelación de las células congeladas y la repetición de las etapas (ii) y (iii) se lleva a cabo una vez; o
- 10 e) una combinación de dos o más cualesquiera de (a) a (d).
14. Una composición farmacéutica que comprende una suspensión de una población sustancialmente homogénea de células madre humanas adultas en un crioprotector libre de proteínas a una concentración de al menos $1,5 \times 10^7$ células por ml, obtenida u obtenible de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13.
- 15 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 14 para usar como medicamento.
16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 14 para usar en regeneración de tejidos, inmunosupresión y/o como fármaco antiinflamatorio.
- 20 17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 14 para usar en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno seleccionados de un trastorno de tejido isquémico, un trastorno de disfunción o de destrucción de tejido, un trastorno autoinmunitario, rechazo de trasplante y una enfermedad o un trastorno inflamatorios en un sujeto.
- 25 18. La composición para el uso de la reivindicación 17, en donde la enfermedad o el trastorno se seleccionan del grupo que consiste en cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, isquemia de la extremidad crítica, herida isquémica, lesión por reperfusión isquémica/disfunción de injerto de órgano primario, reparación de disco intervertebral, miocardiopatía dilatada no isquémica, un trastorno de cartílago articular, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, diabetes tipo 1, enfermedad renal, artritis reumatoide, rechazo de un órgano trasplantado, diabetes tipo 2, hipertensión arteriopulmonar y sepsis.
- 30 19. La composición para el uso de la reivindicación 18, en donde la enfermedad o el trastorno son cardiopatía isquémica, y en donde se administran al sujeto de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 5×10^8 células en como máximo aproximadamente 5 ml mediante inyección intramiocárdica.
- 35 20. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde el sujeto no es el donante del tejido adiposo.
- 40 21. La composición para el uso de la reivindicación 20, que comprende repetir la administración al paciente al menos una vez, opcionalmente en donde el tejido adiposo es de un donante diferente.

FIG. 1

