MÉTODO DE ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES PARA INDUCIR EXPRESIÓN DE FACTORES INMUNOMODULADORES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al campo general de la medicina, particularmente a la terapia celular y medicina regenerativa, y más particularmente a un método de estimulación de células estromales mesenquimales para inducir la expresión de factores inmunomoduladores, y una composición farmacéutica que comprende una población de células estromales mesenquimales obtenidas mediante dicho método. La invención también se refiere a las aplicaciones de dicha composición farmacéutica en condiciones de naturaleza autoinmune o asociadas con inflamación aguda o crónica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las estrategias de terapia celular basadas en el uso de células estromales mesenquimales (CEM) se han convertido en una herramienta en expansión para la medicina regenerativa. La creciente evidencia clínica acumulada en los últimos años ha demostrado la viabilidad de la aplicación de terapias basadas en CEM en términos de bioseguridad y potencial terapéutico en una variedad de patologías asociadas a la autoinmunidad, inflamación crónica y regeneración osteoarticular. Se han desarrollado múltiples ensayos clínicos con terapias basadas en CEM para una variedad de afecciones inflamatorias crónicas y agudas que incluyen diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad de injerto contra huésped. En línea con lo anterior, las CEM han mostrado un perfil robusto de bioseguridad y respuestas clínicas objetivas que indicarían una adecuada eficacia, evidenciando en muchos casos el control de las respuestas inmunes e inflamatorias, el alivio de los síntomas y una mejor calidad de vida de los pacientes tratados [Kieran, K., et al., A Systematic Review of Clinical Studies Investigating Mesenchymal Stem Cells for Fracture Non-Union and Bone Defects. Current Stem Cell Research & Therapy, 2018. 13(4): p. 284-291]. Recientemente se tiene evidencia de que la maquinaria molecular de las CEM induce

respuestas inmunes multifacéticas a nivel celular y tisular, lo que las convierte en una plataforma atractiva para desarrollar terapias inmunes basadas en células.

Uno de los principales aspectos que impacta no solo la eficacia terapéutica sino también el proceso de fabricación de terapias celulares con CEM humanas es la introducción de fuentes alternativas para la obtención de las mismas, con el fin de mejorar la disponibilidad y la viabilidad de la ampliación del producto para uso clínico. Las CEM aplicadas a terapia inmunológica se han aislado y expandido con éxito a partir de una variedad de fuentes, como la médula ósea o el tejido adiposo. Sin embargo, recientemente se ha estudiado una fuente atractiva de CEM que es el cordón umbilical (CU), un subproducto comúnmente desechado después del parto. Las CEM derivadas de CU humano (CEM-CU) han ganado especial atención debido a su alta disponibilidad y fácil acceso. Cabe destacar que, dado su origen fetal, las CEM-CU presentan ventajas particulares, tales como multipotencia mejorada, mayor diferenciación y mayor capacidad de proliferación [Jin, H.J., et al., Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. International Journal of Molecular Sciences, 2013. 14(9): p. 17986-18001], [Wu, M., et al., Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord. Scientific Reports, 2018. 8(1): p. 5014], [Hsieh, J.-Y., et al., Functional Module Analysis Reveals Differential Osteogenic and Stemness Potentials in Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Wharton's Jelly of Umbilical Cord. Stem Cells and Development, 2010. 19(12): p. 1895-1910].]. Además, la evidencia reciente también ha sugerido efectos inmunomoduladores más potentes de las CEM-CU *in vitro* e *in vivo* [Kim, J.-H., et al., Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. Stem cells international, 2018. 2018: p. 8429042-8429042].

La introducción de CEM-CU como herramienta terapéutica ha abierto nuevos espacios para el uso clínico en el entorno alogénico, teniendo en cuenta que el uso de CEM para aplicaciones clínicas se ha restringido principalmente a la configuración autóloga [Oliver-Vila, I., et al., Evaluation of a cell-banking strategy for the production of clinical grade

mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly. Cytotherapy, 2016. 18(1): p. 25-35]. Por lo tanto, el establecimiento de bancos de CEM-CU de grado clínico se ha vuelto factible dada la ventaja de la disponibilidad inmediata de tejidos de cordón umbilical para la producción de terapias basadas en CEM, particularmente en las instalaciones de registros públicos de sangre de cordón umbilical ya establecidos. Mientras el uso alogénico de CEM demuestre ser efectivo y seguro, los bancos de CEM-CU de grado clínico pueden proporcionar acceso ilimitado a las terapias celulares inmunes.

En el estado del arte se evidencian procesos para la expansión de CEM derivadas de diversas fuentes y sus posibles aplicaciones. Existen también estudios en los que las CEM-CU son usadas como potencial herramienta de terapia en enfermedades reumatológicas u otras. En algunos casos se trata de células modificadas genéticamente para producir un factor de crecimiento de manera constitutiva. Dependiendo de la aplicación clínica, se evidencian también otras soluciones de preparación en biogeles, o la combinación de múltiples "*células con potencial regenerativo*".

Por ejemplo, la patente US20180236003A1 divulga una composición que comprende un medio enriquecido con un glicoconjugado de alto peso molecular con o sin CEM derivadas de tejido adiposo expandidas, así como el método para preparar dicho medio. Adicionalmente, se refiere a un método para preparar una composición que comprende un secretoma estable, en el que dicha estabilidad comprende la retención de al menos 60% de actividad después de un mes a temperatura ambiente. Dicho secretoma estable comprende uno o más factores seleccionados entre IFN-γ, IL-8, IL-9, IL-12, IL-15, TNF-α, IL-10, MCP-1, RANTES, GM-CSF, IP-10, PDGF-bb, VEGF, IL-6, y VEGF. De la misma manera, se divulga un método para la producción a gran escala de CEM cultivadas y un método para tratar una afección inflamatoria, o para aliviar el dolor asociado con una afección inflamatoria, o para tratar el dolor neuropático, que comprende la administración tópica de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende medios condicionados con el cultivo *in vitro* de CEM.

La patente CN108588017 divulga un método para separar y cultivar células estromales mesenquimales derivadas de cordón umbilical y la aplicación de las CEM obtenidas mediante el proceso anterior, junto con PRP y ácido hialurónico en los huesos y articulaciones para el tratamiento de osteoartritis.

La patente US20180325957A1 divulga una composición que comprende una suspensión de células mesenquimales estromales inmunosupresoras derivadas de tejido adiposo humano en una concentración mínima de 1.5×10^7 células/mL, caracterizadas además porque tras estimularse con interferón-γ durante 3 días, expresan 80% más de CD274 y 25 veces más CD54. Así mismo, D3 divulga el método para obtener dicha composición.

Por lo tanto, mientras la investigación de las funciones inmunomoduladoras de las CEM-CU continúe expandiéndose, persiste el interés por ofrecer estrategias mejores y más eficientes para la terapia con células inmunes, como también la necesidad de desarrollar procesos para la producción de células y el escalamiento para su uso clínico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de estimulación de células estromales mesenquimales para inducir la expresión de factores inmunomoduladores, y una composición farmacéutica que comprende una población de células estromales mesenquimales obtenidas mediante dicho método. La invención también se refiere a las aplicaciones de dicha composición farmacéutica en condiciones de naturaleza autoinmune o asociadas con inflamación aguda o crónica.

El método de la presente invención comprende cultivar y expandir CEM en un medio de cultivo con un suplemento enriquecido con factores estimuladores de inmunomodulación y de inducción de fenotipo inmunomodulador, así como la adición de citoquinas inflamatorias o exposición a leucocitos inmunoactivados de las CEM-CU para potenciar su efecto modulador del sistema inmune.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Métodos de aislamiento y cultivo del CEM-CU. (A) Tres metodologías de aislamiento de CEM-CU (digestión enzimática del tejido total de cordón, digestión de la gelatina de Wharton (WJ) y explante de la WJ) se analizaron a prueba para determinar la eficiencia y rendimiento del aislamiento celular de tejidos del cordón umbilical. (B) Tiempo (en días) para la obtención del primer explante en las tres metodologías. (C) Nivel de doblaje poblacional por pase de CEM-CU suplementadas con hLP de diversos grupos sanguíneos en comparación con suero fetal bovino (FBS). (D) Doblajes poblacionales acumulados de diversos donantes de CEM-CU en comparación con FBS.

FIG. 2 Ensayos basados en la estimulación del crecimiento y secreción de factores inmunomoduladores de CEM-CU con medio de cultivo enriquecido con una preparación "in-house" de suplemento basado en hLP, comparado con suplemento estándar basado en Suero Fetal Bovino (FBS). (A) se observa el efecto del suplemento en relación con el crecimiento -expansión- celular, demostrando superioridad del hLP sobre el suero humano y el suero fetal bovino. (B) se evidencia el consumo de factores estimuladores por parte de las CEM-CU que indica el metabolismo activo y la estimulación específica de las CEM-CU durante expansión. (C) se demuestra la liberación sostenida de señales de inmunomodulación y regeneración por parte de CEM-CU mediante la aplicación de la metodología de expansión desarrollada. *=hPL vs. FBS, $p<0.05$

FIG. 3 Resultados de pruebas *in vitro* efecto anti-inflamatorio de CEM-CU. Inmuno ensayos basados en la supresión de la proliferación de linfocitos T (CD3+) evaluado al día quinto (5) post-cultivo a partir de la determinación absoluta del número de CD3+ contenidas en células mononucleares (CMN) no activadas (reposo), activadas o activadas y co-cultivadas con CEM-CU (CMN+MSC). (A) activadas con fito-hemaglutinina (PHA). (B) activadas con anti-CD3/CD28 (αCD3/CD28). *=CMN (reposo) vs. CMN (activadas), $p<0.05$. #=CMN (activadas) vs. CMN (activadas)+MSC, $p<0.05$. En ambos modelos de inmuno estimulación se evidencia la absoluta inhibición de la proliferación de linfocitos T

activados, indicando un potente efecto inmunosupresor de las CEM-MSC sobre células del componente inmunológico en estado de inflamación/inmuno-activación.

Inducción de cambios a nivel transcriptómico en CEM-CU en reposo o en inmunomodulación. Inducción de cambios a nivel transcriptómico en CEM-CU en reposo o en inmunomodulación. (C) Volcano plot de genes diferencialmente expresados (DEG) entre las tres condiciones experimentales (C1: células en estado basal o CEM-CU; C2: CMN (activadas)+CEM-CU; C3: CEM-CU no inmunoactivadas, pero expuestas al fármaco de inmunoestimulación de leucocitos PHA+CEM-CU. Se observó la inducción de 6.077 genes en las células inmunoactivadas. (D) Patrones de expresión de genes diferencialmente expresados. Aproximadamente 2.600 inducidos a la alta y 3.500 regulados a la baja en CEM-CU en estado de inmunomodulación. (E) Niveles de expresión estandarizada de genes inmunomoduladores en CEM-CU en inmunomodulación (C3) vs. Controles (C1 y C2). Entre los genes predominantemente inducidos se encontraron genes que participan activamente en vías de señalización inmunológicas caracterizadas por la supresión/inmunomodulación de respuestas inmunes.

FIG. 4 Producción de señales inmunomoduladoras por parte de CEM-CU en modelos de inflamación. (A) CEM-CU fueron expuestas a células mononucleares (CMN) inmuno-activadas con fito-hemaglutinina (PHA) o anti-CD3/CD28 en una configuración de contacto celular (barras grises) o separadas a través de una membrana de 0.4µm (barras negras) y la producción de los factores G-CSF, IL-10, MCP-1, IL-6 e IP-10 se evaluó al quinto día de estimulación. *=CEM-CU vs. PHA+CEM-CU, αCD3/CD28+CEM-CU o CK+CEM-CU en configuración dependiente de contacto celular, $p<0.05$. #=CEM-CU vs. PHA+CEM-CU o αCD3/CD28+CEM-CU en configuración independiente de contacto celular, $p<0.05$. (B) Adicionalmente, se pudo determinar que la preparación de CEM-CU expuesta a un ambiente pro-inflamatorio indujo el incremento significativo de potentes señales inmunomoduladoras tales como la producción del receptor soluble de IL-2 (IL-2R) y la expresión de las moléculas estimuladoras del checkpoint inmunológico PD-L1 y PD-L2 en CEM-CU estimuladas con IL-1b y TNFα (CK).

FIG. 5 Caracterización de la población de CEM-CU. (A) Micrografías representativas de CEM-CU de diferentes donantes (n=4) que fueron caracterizados en términos de potencial de diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico y adipogénico. (B) Caracterización del inmunofenotipo de CEM-CU a partir de la evaluación de marcadores de identidad mesenquimal (CD90, CD73, CD105, CD274) y exclusión de marcadores hematopoyético/endotelial (CD45, CD34, HLA-DR y CD31).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para la interpretación de esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones, y cuando sea apropiado, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural. Así, los términos utilizados en la descripción tienen los siguientes significados a menos que el contexto indique claramente lo contrario:

Células mononucleares (CMN) de sangre periférica (PBMC): células contenidas en compartimientos hematopoyéticos de los mamíferos tales como la médula ósea, la sangre periférica y el bazo, y que comprende mayoritariamente el componente celular mononuclear del sistema inmune y hematopoyético en donde se encuentran los linfocitos, los monocitos, las células dendríticas y las células Natural Killer. Estas células se pueden aislar a través de metodologías basadas en el uso de coloides como el Ficoll y gradientes de centrifugación que separa el componente mononuclear del componente polimorfonuclear y el componente eritroide de estos fluidos.

Uso Autólogo: En el contexto de trasplante de órganos, tejidos y células, hace mención a la procedencia del injerto (células, tejido, órgano), que en este caso es del mismo individuo. En el caso contrario, cuando la procedencia del tejido es de otro individuo, se denomina “uso alogénico”.

Uso Heterólogo: En el contexto de trasplante de tejidos y células se refiere al uso final del injerto para suplir, reemplazar o mejorar la función del tejido receptor. En este caso, el uso heterólogo indica que el injerto (célula o tejido) no se usará en el receptor para la función o

estructura originaria. Es el caso del uso de la membrana amniótica para la reparación de lesiones corneales o epidermales, el uso de las células progenitoras hematopoyéticas para el tratamiento de hipoxia cerebral o cardiaca, etc.

Lisado de plaquetas humano (hPL): suplemento de cultivo celular derivado de hemocomponentes, específicamente de plasma rico en plaquetas o concentrados de plaquetas obtenidos de donantes de sangre, generalmente de un banco de sangre.

Factores inmunomoduladores: factores producidos y secretados por diversas células del componente inmune y del tejido conectivo, cuyo efecto principal es la regulación de la actividad inflamatoria de las células inmunológicas durante la fase inflamatoria de un proceso de lesión o infección en el tejido afectado.

Gelatina de Wharton (WJ): corresponde a la mayor parte del tejido que compone el cordón umbilical en los mamíferos. Este tejido compuesto de colágeno y proteoglicanos rodea los vasos sanguíneos del cordón. Es también la principal fuente de células mesenquimales del estroma del cordón.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium): Es un medio de cultivo consistente en una formulación estándar de aminoácidos, azúcar, vitaminas e iones necesarios para el crecimiento de diversos tipos celulares. Es el medio estándar empleado para el crecimiento de las células estromales mesenquimales de cualquier origen.

Células estromales mesenquimales (CEM)

Las células estromales mesenquimales (CEM) consisten en una población heterogénea de células multipotentes localizadas en el intersticio de todos los tejidos humanos, que proliferan *in vitro* adheridas al plástico, tienen morfología similar a la de fibroblastos y pueden diferenciarse a células del linaje mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos; han sido consideradas una herramienta importante para la terapia celular de diversas condiciones patológicas de componente inflamatorio y de daño tisular.

Las células estromales mesenquimales (CEM) son fundamentales para modular las respuestas inmunitarias en el contexto de la inflamación. Según la evidencia acumulada durante la última década, las CEM se han convertido en una plataforma atractiva para desarrollar terapias inmunes basadas en células aprovechando su maquinaria molecular para impulsar respuestas inmunes multifacéticas a nivel celular y tisular [Pers, Y.M., et al., Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives. Osteoarthritis and Cartilage, 2015. 23(11): p. 2027-2035]. Las terapias basadas en CEM se han utilizado clínicamente en varios ensayos, donde se han inscrito más de 32000 pacientes con una variedad de afecciones inflamatorias crónicas y agudas que incluyen diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad de injerto contra huésped (ClinicalTrials.gov).

La comprensión actual de los mecanismos moleculares de inmunosupresión modulada por CEM apunta a una lesión o inflamación local como desencadenantes para inducir la proliferación / activación de células T reguladoras, la anergia de células T efectoras, la modulación de los macrófagos y células dendríticas a través de la activación de vías moleculares que implican la liberación de factores solubles o la alteración metabólica de componentes celulares inmunes [Wang, M., Yuan, Q. & Xie, L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. Stem Cells Int. 2018, (2018)]. Aun cuando no se comprenden completamente los mecanismos por los cuales las CEM ejercen la supresión inmune, los datos *in vitro* e *in vivo* indican que las CEM actúan en diferentes subconjuntos celulares implicados en el inicio y mantenimiento de las respuestas inmunes a nivel local y sistémico [Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C. & Noël, D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. PLoS One 5, (2010)]. Las CEM pueden restringir la proliferación de linfocitos T y B y suprimir su actividad efectora [Laing, A. G. et al. Mesenchymal stem cells inhibit T-cell function through conserved induction of cellular stress. PLoS One 14, 1–13 (2019)]. Del mismo modo, la diferenciación, la presentación del antígeno y la función de coestimulación de las células dendríticas, así como la actividad inflamatoria de los macrófagos se alteran en presencia de CEM [Jiang, X. X. et al. Human mesenchymal stem

cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood 105, 4120–4126 (2005)].

Si bien existe un debate sobre si los mecanismos de supresión inmune vinculados a CEM dependen o no del contacto celular, existe un amplio consenso en cuanto a que los factores secretados juegan un papel clave durante la supresión inmune mediada por CEM. Sin embargo, queda por resolver la gran complejidad de las redes de modulación inmune que gobiernan la matriz celular y molecular por CEM, para desarrollar nuevas herramientas moleculares y aplicaciones en el campo de las terapias basadas en CEM.

A pesar de su homogeneidad en términos de identidad y potencia, las CEM de diferentes orígenes comparten características biológicas, pero difieren en otros aspectos como por ejemplo el inmunofenotipo. Por ejemplo, las CEM obtenidas a partir de tejido adiposo son positivas en pases tempranos para CD34, mientras CEM de otras fuentes no expresan este marcador [Cassatella, M.A., et al., Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. Stem Cells, 2011. 29(6): p. 1001-11.]. Kern y colaboradores compararon CEM aisladas de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical encontrando que las CEM obtenidas de médula ósea tienen la capacidad de proliferación más baja, en términos de tasa de proliferación y número de doblajes poblacionales, mientras que las CEM de cordón umbilical muestran la tasa más alta de proliferación. Similarmente, el potencial de diferenciación de las CEM también ha registrado diferencias respecto al origen de las células, teniendo entonces que las CEM aisladas de pulpa dental se diferencian preferiblemente en dentina en lugar de hueso en ensayos *in vivo* [Gronthos, S., et al., Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res, 2002. 81(8): p. 531-5]. Las CEM de medula ósea presentan una tendencia marcada a diferenciarse en condrocitos y osteocitos en comparación con las CEM de tejido adiposo, que son más eficientes en estimular la angiogénesis. Finalmente, respecto a los análisis de expresión genética, las CEM muestran una alta expresión de genes asociados con diferenciación osteogénica para CEM de médula ósea, mientras que CEM de cordón umbilical muestran una alta expresión de genes involucrados en angiogénesis [Panepucci, R.A., et al., Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived

mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2004. 22(7): p. 1263-78]. En ensayos de inmunomodulación *in vitro*, se ha demostrado que a pesar que las CEM de medula ósea y tejido adiposo tienen efectos inmunomodulatorios similares al suprimir la proliferación de células mononucleares de sangre periférica e inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas, las CEM de tejido adiposo tienen un efecto inmunomodulador más potente en relación dosis-respuesta en comparación con las de médula ósea. Esto puede ser explicado por su alta actividad metabólica, resultando en una alta producción de citoquinas involucradas en los mecanismos inmunosupresivos y anti-infamatorios. Las CEM de tejido adiposo son genética y morfológicamente más estables en cultivo por largo tiempo, muestran baja tasa de senescencia y alta capacidad proliferativa, además de mantener el potencial de diferenciación comparado con CEM de medula ósea [Hua, J., et al., Small Molecule-Based Strategy Promotes Nucleus Pulposus Specific Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Mol Cells, 2019. 42(9): p. 661-671.].

Una gran dificultad para la traslación clínica de productos basados en CEM es la necesidad de alcanzar dosis (número de células) adecuadas para obtener efectos clínicos. En ese sentido el fácil aislamiento y potencial de expansión son determinantes para la selección de la mejor fuente de estas células. Las CEM que han sido más utilizadas y estudiadas son las obtenidas por médula ósea y tejido adiposo. De medula ósea la cantidad que se puede obtener es limitada, entre 0.001 a 0.01% [Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999; 284(5411):143-7], mientras que en 1g de tejido adiposo se pueden aislar $5x10^3$ células [Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol. 2006; 24(4):150-4. Epub 2006 Feb 20]. Pero la eficiencia de CEMs obtenidas de WJ está en el rango de 1 a $5x10^4$ células por centímetro de cordón umbilical [Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao MS, Velagaleti G, Troyer D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. Stem Cells. 2006; 24(3):781-92. Epub 2005 Oct 13]. Adicional a eso, las CEM adultas como consecuencia del tiempo presente en el cuerpo, son susceptibles a la acumulación de daño celular, el cual puede llevar a la

muerte celular, senescencia o la perdida de la función regenerativa y en casos extremos a una transformación neoplásica. Por otro lado, las CEM de tejidos neonatales como la WJ están a salvo de estos factores [Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. Biomed Res Int. 2015; 2015:430847. doi: 10.1155/2015/430847. Epub 2015 Mar 15]. Se ha registrado que la edad del donante de las CEM afecta varias propiedades de las células [Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone. 2003 Dec;33(6):919-26], por ejemplo, Duscher y colaboradores demostraron que la edad del donante de CEM de tejido adiposo compromete la habilidad de las células de apoyar la formación de redes vasculares [Duscher D, Rennert RC, Januszyk M, Anghel E, Maan ZN, Whittam AJ, Perez MG, Kosaraju R, Hu MS, Walmsley GG, Atashroo D, Khong S, Butte AJ, Gurtner GC. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. Sci Rep. 2014 Nov 21;4:7144. doi: 10.1038/srep07144.]. En el caso de CEM de medula ósea se ve implicado su potencial para mejorar el injerto de otras células. Kočí y colaboradores demostraron que el estilo de vida de los donantes también puede afectar el potencial de las células, así, CEM de medula ósea obtenidas de ratones obesos presentaban una reducción en su potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico y las CEM de tejido adiposo aumentaban su diferenciación adipogénica y osteogénica y reducían el potencial condrogénico. Por lo anterior, se puede deducir que el microambiente de varias enfermedades pueden influenciar las CEM, por lo que el aislamiento de CEM a partir de pacientes con enfermedades metabólicas no pueden ser útiles como recurso autólogo para terapia celular [Kočí Z, Turnovcová K, Dubský M, Baranovičová L, Holáň V, Chudíčková M, Syková E, Kubinová S. Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic patient's distal limbs with critical ischemia. Cell Biochem Funct. 2014 Oct;32(7):597-604. doi: 10.1002/cbf.3056. Epub 2014 Sep 23].

Mucho del conocimiento actual sobre las propiedades biológicas y terapéuticas de las CEM ha sido generado a partir de estudios realizados en la medula ósea. Sin embargo, el uso de otras fuentes alternativas de tejidos tales como tejido adiposo, placenta, piel, pulpa dental, sangre de cordón umbilical, fluido amniótico, células perivasculares de cordón umbilical,

WJ, tejido sinovial, leche materna y sangre menstrual, ha empezado a ganar interés dado la facilidad de colección de algunos de estos tejidos, evitando el uso de técnicas invasivas como lo es el procedimiento de aspiración de la medula ósea durante su aislamiento.

CEM de cordón umbilical (CEM-CU)

Las CEM-CU son candidatas prometedoras para la terapia celular debido a su potente diferenciación multilinaje, mayor capacidad de autorrenovación y disponibilidad inmediata para uso clínico. La experiencia clínica ha demostrado perfiles de bioseguridad satisfactorios y la viabilidad de la aplicación CEM-CU.

Se desarrolló un ensayo inmune robusto *in vitro* para medir diversas facetas de las respuestas inmunitarias desencadenadas por CEM-CU, integrando transcriptoma completo, secretoma y respuestas celulares bajo modulación inmunológica experimental. Se llevaron a cabo análisis exhaustivos para validar las vías moleculares ya conocidas involucradas en la modulación inmune mediada por CEM e identificar nuevos candidatos para el control de la inflamación y la activación inmune por CEM-CU.

Subramanian y colaboradores caracterizaron CEM aisladas de diferentes compartimientos del cordón umbilical: amnios, subamnion, perivascular, WJ y el fragmento completo del cordón. Registrando que las CEM de la WJ son superiores a las aisladas de los demás compartimientos en términos de utilidad clínica debido a que su aislamiento es simple, rápido y fácil de estandarizar, presentan reducida contaminación de otras células, son ricas en características de progenicidad, se pueden generar en grandes cantidades con una manipulación mínima, son altamente proliferativas y tienen potencial de diferenciación amplia y eficiente [Subramanian A, Fong C-Y, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. Pera M, ed. PLoS ONE. 2015;10(6):e0127992].

Método para obtener una población de CEM inmunomoduladoras

Aislamiento de CEM-CU

Las CEM para efectos de la presente invención, pueden ser aisladas a partir de aspirados de médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, sangre de cordón umbilical, tejido placentario, fluido menstrual o líquido amniótico. En una modalidad particular, las CEM son aisladas de cordón umbilical (CEM-CU), más particularmente de WJ.

En general, se han descrito en detalle un sin número de métodos para el aislamiento de CEM de virtualmente cualquier tejido. Es así como desde la década pasada se aislaron CEM de médula ósea [Herzog, E. L., Chai, L. and Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 102, 3483-3493.], tejido adiposo [Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7, 211-228], tejido tendinar [Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A. and Noda, M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. Exp. Cell Res. 287, 289-300], ligamento periodontal [Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y. and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364, 149-155], membrana sinoval [De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. and Luyten, F. P. (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum. 44, 1928-1942], pulmón [Sabatini, F., Petecchia, L., Tavian, M., de Villeroche, V. J., Rossi, G. A. and Brouty-Boye, D. (2005). Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. Lab. Invest. 85, 962-971], tejidos perivascular [Farrington-Rock, C., Crofts, N. J., Doherty, M. J., Ashton, B. A., Griffin-Jones, C. and Canfield, A. E. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. Circulation 110, 2226-2232] entre otros [da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 11): p. 2204-13]. La obtención de CEM a partir del CU tiene diversas ventajas por ser un tejido removido por métodos no invasivos y considerado un desecho médico.

Cultivo y expansión de CEM

Medio de cultivo

De acuerdo con la presente divulgación, el método para obtener una población de CEM-CU que poseen potentes propiedades inmunomoduladoras comprende cultivar y expandir las CEM-CU en un medio de cultivo con un suplemento de factores estimuladores de inmunomodulación, adicionar citoquinas o exponer a leucocitos autólogos inmunoactivados.

El medio de cultivo puede ser uno normalmente empleado en la técnica, los cuales se seleccionan entre diversas preparaciones entre las que se incluye alfa-MEM, DMEM-F12 y otras formulaciones comerciales disponibles tales como medios de crecimiento mesenquimal de Lonza®, Macropharma® o Stem Cell Technologies®. En una modalidad de la presente invención el medio de cultivo empleado es medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium).

Las fracciones obtenidas tanto por digestión enzimática, como por gradiente de centrifugación son cultivadas en frascos de cultivo de poliestireno, el cual promueve la adhesión celular, una de las principales propiedades de las CEM de cualquier origen. Las CEM son cultivadas en medios enriquecidos con factores estimuladores de inmunomodulación, mayoritariamente FBS, suero humano, plasma rico en plaquetas y hPL, de acuerdo al protocolo específico para cada laboratorio.

Un aspecto esencial en la fabricación de productos basados en células, es el uso de suplementos de factores estimuladores de inmunomodulación que cumplan con los criterios para uso en humanos. Algunos suplementos disponibles en el mercado incluyen FBS, y otros suplementos de crecimiento específicos para células mesenquimales fabricados por Lonza®, Macropharma® o Stem Cell Technologies® que tienen la ventaja de no contener componentes xenogénicos y están certificados para uso en manufactura de medicamentos en humanos. Otras preparaciones "*in house*" incluyen el uso de suero humano o suero convertido de plasma humano pobre en plaquetas, el cual ha demostrado también soportar el crecimiento de CEM, aunque con eficiencias inferiores al compararlas con el hPL.

De acuerdo con la presente divulgación, se emplea un suplemento compuesto por factores solubles de los cuales las CEM-CU aisladas son altamente dependientes para proliferar y sobrevivir. Estos factores son el factor de crecimiento fibroblastoide (FGFb), la familia del factor derivado de plaquetas (PDGF) AA, BB y AB, el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor TGFα, angiogenina, el factor de crecimiento vascular (VEGF) y las quimioquinas CXCL2, CCL5. A su vez, dichos factores inducen un incremento significativo en la vitalidad y capacidad de división celular que a la larga le confiere mayor vida útil al producto celular.

En una modalidad de la presente invención, el medio de cultivo DMEM está enriquecido con un suplemento de factores estimuladores de inmunomodulación que incluyen, sin limitarse a aquellas moléculas solubles presentes en el plasma humano rico en plaquetas y su derivado final, el hPL. En una modalidad particular, el medio de cultivo DMEM está suplementado con hPL entre el 5 y el 15 % v/v del medio de cultivo. En una modalidad más particular, el hPL se encuentra en una concentración de 10% v/v en el medio de cultivo.

Obtención del hPL

Para efectos de la presente invención, el hPL se obtiene a partir de plaquetas de donantes de sangre sanos (A+, B+, O+ y O-), mediante una secuencia de ciclos de congelación y descongelación para inducir la lisis de las plaquetas. Los lisados de plaquetas se centrifugan y los sobrenadantes se filtran, se dividen en alícuotas y se almacenan hasta su uso.

Para el cultivo de las CEM-CU, se agrega de 5 a 10ml de medio suplementado. La positividad de los cultivos se evalúa 48 horas después de este proceso. El medio de cultivo es renovado cada tercer día, cambiándose la mitad de volumen de medio por medio fresco hasta que las células alcancen un 75-85% de confluencia. Concluida esta primera fase de cultivo, se efectúa la primera tripsinización del cultivo y tras la inactivación de la tripsina con medio suplementado, se centrifuga y el pellet celular es suspendido en 10 ml de medio suplementado y sembrado en caja de Petri para cultivo celular.

Expansión de las CEM

El cultivo con medio suplementado se realiza durante 10 a 17 días, hasta la obtención de una suspensión celular que se lleva a cultivo por otros 4 a 7 días, para la obtención final de una preparación denominada "master cell bank - MCB". Esta MCB se criopreserva por un método conocido en la técnica. En una modalidad particular, el método de criopreservación comprende el uso de un búfer fosfato salino, medio DMEM o solución fisiológica, un estabilizante (entre el 12,5 y 15% v/v) y un solvente orgánico que actúa como criopreservante (10% v/v). En una modalidad aún más particular, el estabilizante es albúmina sérica bovina y el solvente orgánico es dimetil sulfóxido (DMSO).

A partir del MCB se genera un nuevo cultivo celular usando la misma formulación de medio empleado anteriormente. El cultivo se lleva a cabo en condiciones estándar que comprenden incubación a 37 ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad y presión normal de O_2 (19-21%) hasta obtener el número celular indicado para la aplicación celular final el cual debe estar entre 3 y $5x10^6$ células por mililitro. Este producto denominado "drug product-DP" es criopreservado para control de calidad realizado a cada lote. Una vez este proceso se realiza a conformidad (liberación de lotes de producción) y atendiendo una demanda clínica específica, la preparación es descongelada y envasada (formulada) en su presentación final entre 24 y 48 horas previa a su aplicación final.

Inducción del efecto terapéutico inmunomodulador de CEM-CU

De acuerdo con la presente divulgación, durante el periodo de preparación del DP, las células son estimuladas para adquirir un fenotipo inmunomodulador a partir de la exposición al medio de cultivo suplementado con hPL o alternativamente, a la estimulación con citoquinas o leucocitos del mismo paciente, que han sido previamente inmunoactivados con el fin de inducir un estado anti-inflamatorio previo a su aplicación final.

Las CEM-CU estimuladas mediante el método de la presente invención, adquieren un estado (fenotipo) no descrito anteriormente, asociado a un potente efecto inmunomodulador que se caracteriza por la inhibición directa de la proliferación de linfocitos T y la inducción de un fenotipo inmunomodulador de monocitos/macrófagos humanos. En un estado inflamatorio

propio de diferentes condiciones inflamatorias crónicas (por ejemplo, enfermedades autoinmunes), las CEM-CU activan diversos mecanismos de inmunomodulación a través de la inducción de factores inmunomoduladores, contacto célula-célula, polarización de macrófagos hacia estados inmunomoduladores y la activación de mecanismos de checkpoint inmunológico en linfocitos T activados. Estos efectos se encontraron en CEM-CU inmunoactivadas mediante la expresión aumentada de: receptor soluble de IL-2 (sIL-2r), CD274 (PD-L1), TIM-1 y CD131, adicional a otros marcadores ya descritos con anterioridad. Estas células en estado anti-inflamatorio expresan alrededor de 6000 genes implicados en numerosas vías de control de la respuesta inmune, sobrevida, etc.

De manera relevante, el fenotipo anti-inflamatorio e inmuno-modulador inducido en las CEM mediante el método de estimulación aquí descrito se caracteriza por la expresión aumentada del ligando 1 del factor de muerte programada (PD-L1) y la producción y liberación de factores inmunomoduladores tales como interleucina (IL)-6, el factor de crecimiento de colonias granulocito y granulocito -macrófago (G-CSF y GM-CSF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que en últimas impacta en la modulación de respuestas inmunes del compartimento celular linfoide y mieloide en el contexto de inflamación tisular.

En una modalidad particular de la presente invención, el método de estimulación que conduce a la generación del fenotipo inmunomodulador de un producto de CEM-CU comprende la expansión de CEM-CU en un medio con suplemento preparado por una metodología "*in house*" basada en una preparación de hPL enriquecido con factores como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), RANTES, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor inductor de macrófagos (MIF) y el factor de crecimiento tumoral alfa (TGFα).

En otra modalidad de la presente invención el efecto se puede potenciar mediante la estimulación de las CEM-CU con citoquinas (que para efectos de la presente invención se seleccionan entre, sin limitarse a, IL1 alfa, IL1 beta, TNF alfa, IFN-gamma, LPS o mezclas de las mismas) o la adición al producto final de leucocitos del receptor activados.

Tanto la estimulación con citoquinas como la adición final de leucocitos del receptor previamente inmuno-activados, comprende una fase final de manufactura del producto. En una modalidad que emplea citoquinas, la fase final comprende la adición de cada proteína recombinante a una concentración entre 5-50 ng/mL por 24-48 horas previas a la formulación final del producto. En una modalidad que emplea leucocitos activados del receptor final, el proceso incluye la obtención de una muestra de sangre periférica del paciente, el aislamiento de CMN y posterior incubación por 24 horas con fitohemaglutinina o anticuerpos dirigidos contra el receptor CD3 de los linfocitos para inmunoactivar el componente linfocitario y mononuclear. Posterior a la incubación la suspensión de CMN inmunoactivados es añadida en la preparación final de CEM-CU e incubada por 24 a 48 horas adicionales antes de su empacado final.

Composición farmacéutica

El uso clínico de las CEM se ha consolidado como una de las terapias celulares más aplicada en el escenario clínico para una gran variedad de condiciones clínicas agudas y crónicas. Si bien se han descrito CEM provenientes de diferentes fuentes tisulares, las CEM de médula ósea y tejido adiposo han sido aplicadas mayoritariamente en el ámbito clínico, esencialmente en un esquema de uso autólogo, es decir, el producto celular se deriva del mismo paciente que ha de ser tratado, con la subsecuente complejidad operativa y logística, aunado a la demora que implica la obtención del tejido, su procesamiento y posterior aplicación de manera personalizada.

El desarrollo y potencial aplicación de productos basados en CEM-CU ha abierto una nueva ventana de oportunidad para la generación de productos terapéuticos celulares de uso alogénico (el donante es diferente al receptor). Más aún, la posibilidad de generar bancos maestros de este producto celular ofrece una ventaja adicional al permitir la generación de dosis ilimitadas y disponibles para su uso clínico inmediato. En esta tecnología se describe un flujo de producción en cadena de productos de terapia avanzada basados en CEM-CU de alta reproducibilidad y homogeneidad, con características cuasi genéricas que permitirán resultados clínicos reproducibles durante su aplicación clínica.

Una composición farmacéutica dentro del alcance de la presente invención comprende una población de células estromales mesenquimales de cordón umbilical (CEM-CU) inmunomoduladoras obtenidas mediante el método descrito anteriormente, factores inmunomoduladores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La población de CEM inmunomoduladoras de acuerdo con la presente invención ejerce un potente efecto antiinflamatorios, como consecuencia de la expresión de los factores mencionados anteriormente, así como múltiples represores de la respuesta inmune identificados a nivel transtriptómico.

Los resultados demuestran que las CEM en presencia de linfocitos T humanos activados inducen inhibición del 100% de la proliferación de los linfocitos previamente inmunoestimulados. Esta inhibición está asociada a la inducción de la expresión de CD25 y CD274 en las CEM así como a la acumulación de los factores GM-CSF, G-CSF, IL-10- IL-6, MIG, MCP-1, IP-10, la reducción de factores como MIP-1b, IL1-Ra, TNFalpha entre otros, que están relacionados con la reducción de macrófagos inflamatorios (macrófagos Tipo I), el incremento de macrófagos inmunomoduladores (macrófagos tipo II) y la inducción de linfocitos T de fenotipo terminal (TEMRA).

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en formatos diferentes, dependiendo de la aplicación final. En una modalidad, la composición se formula como inyección en volúmenes de 5 a 10 mililitros para infiltración local. En otra modalidad particular, la composición se formula como suspensión celular (bolsa de infusión intravenosa de hasta 100 ml) con una cantidad celular correspondiente a 2-5 millones de células por Kg de peso del paciente, para aplicación sistémica.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la presente invención se selecciona, sin limitarse a una solución cristaloide balanceada similar al plasma humano en su contenido de electrolitos, osmolalidad y pH entre 7,2 y 7,4; además de la adición de albúmina humana; suero humano AB o alguna otra fuente de macromoléculas que brinden

soporte y estabilidad al componente celular vivo; y soluciones amortiguadoras como fosfatos, agentes de isotonicidad como glucosa, cloruro de sodio y mezclas de los mismos.

En una modalidad particular, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución cristaloide tipo PlasmaLyte, con una adición de 2 % de albúmina humana.

Método de tratamiento

De acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica que comprende una población de CEM inmunomoduladoras, factores inmunomoduladores y un vehículo farmacéuticamente aceptable, puede ser administrada en una cantidad terapéuticamente efectiva a un paciente que lo necesita para el tratamiento de una condición de naturaleza autoinmune o asociada con inflamación aguda o crónica.

El producto enriquecido de células anti-inflamatorias de alta potencia puede ser inyectado localmente o infundido de manera intravenosa en pacientes que cursan con distintas afecciones inflamatorias de carácter crónico y naturaleza autoinmune seleccionadas entre, sin limitarse a artrosis, osteoartrosis, osteoartrosis de rodilla, osteoartrosis de cadera, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, esclerodermia, entre otros.

El producto puede ser administrado por diversas vías parenterales, como inyección local intra-articular o vía intravenosa sistémica. En una modalidad, para aplicación intra-articular la dosis varía entre 5 y $20x10^6$ células en total. En otra modalidad para aplicación intravenosa la dosis varía entre 2 y $10x10^6$ células por Kg de peso del paciente. El régimen de aplicación puede ser en única dosis o en aplicaciones mensuales hasta máximo 3-4 aplicaciones de acuerdo a la condición clínica especificada.

En una modalidad particular el método de tratamiento empleando CEM estimuladas con leucocitos autólogos inmunoactivados comprende obtener los leucocitos mediante venopunción a partir de 15-20 mL de sangre periférica, 48-72 horas previas a la aplicación final del producto de terapia celular. Durante ese periodo se lleva a cabo el aislamiento de

CMN, su cultivo por 24H con el inmunoactivador y la adición final de esta suspensión celular al producto final de CEM-CU. La administración final se realiza en alguna de las presentaciones descritas anteriormente a una dosis dependiente del número final de CEM-CU.

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de una población de CEM-CUs inmunomoduladoras

Aislamiento de CEM-CU

Este estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, Colombia y se obtuvo el consentimiento por escrito de las donantes de cordón umbilical (CU). El CU se colectó manteniendo condiciones de asepsia, de mujeres después de un embarazo a término (cesárea o parto vaginal normal).

Se compararon tres métodos para el procesamiento de CU: digestión enzimática de tejido, digestión enzimática de WJ y explante de WJ. Para el procesamiento de los explantes de WJ, el CU se cortó en trozos de 3 cm y la sangre residual se lavó tres veces con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) 1X (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) que contenía 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) 10.000 U/ ml (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Cada trozo de cordón se cortó longitudinalmente, se retiraron los vasos del cordón y se descartó la capa epitelial. La WJ se retiró, se cortó y se colocó directamente en placas de cultivo de tejidos de 35 mm, que contenían medio DMEM con bajo contenido de glucosa (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), suplementado con 10% de hPL. Estos cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO_2. Al alcanzar una confluencia del 75% al 85%, las células se liberaron de la placa

usando tripsina al 0,25% (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 3 minutos, se contaron y se volvieron a las placas.

Para la digestión enzimática de CU, secciones de 3 cm de longitud de CU se cortaron en trozos pequeños, se añadieron a una solución que contenía colagenasa I al 0,075% (SigmaAldrich, St Louis, MO, EE. UU.) y se incubaron durante 60 minutos a 37ºC en agitación constante. La suspensión celular se pasó a través de un filtro celular de malla de 100 µm, se resuspendió en DMEM suplementado con hPL y se sembró en una placa de 6 pocillos. Las células no adherentes se eliminaron después de 6 horas de cultivo. Para la digestión enzimática de WJ, la WJ se retiró del CU y se digirió en una solución de colagenasa I al 0,075% (SigmaAldrich, St Louis, MO, EE. UU.) durante 60 minutos a 37ºC en agitación constante. Las células se pasaron a través de un filtro celular de malla de 100 µm y se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% de hPL y 1% de P/S. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se mantuvieron hasta la confluencia. Usando estas tres metodologías se obtuvo un 100% de rendimiento al usar digestión enzimática o explante de WJ (**FIG. 1A**). Por su parte la digestión de tejido evidenció un rendimiento de menos del 80%. Una vez iniciados los cultivos tanto de la WJ como del tejido completo del CU, se observó migración y crecimiento (derivación celular) entre 5 y 17 días (**FIG. 1B**). El explante de WJ resulto en tiempos de derivación menores con respecto a la digestión de la WJ o del tejido completo.

Lisado de plaquetas humano (hPL)

En el desarrollo de la presente invención, se estandarizó la producción de hPL derivado de bolsas de plaquetas, para el cultivo celular. Se obtuvo hPL en el banco de sangre institucional a partir de plaquetas de donantes de sangre sanos (A+, B+, O+ y O-). Se congelaron alícuotas de 45 ml (3 donantes) a -80 °C y se sometieron a dos ciclos de congelación y descongelación para inducir la lisis de las plaquetas. Los lisados de plaquetas se centrifugaron luego a 4.000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de 0.2 µm, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. El hPL de tres donantes se

combinó y se añadió a DMEM a una concentración del 10% para usar en el cultivo de CEM. Se añadió heparina recombinante humana a una concentración final de 16 UI / ml.

Cultivo y expansión de CEM-CU en un medio de cultivo con un suplemento de factores estimuladores de inmunomodulación

Para probar la capacidad de los lotes de hPL para soportar el crecimiento de CEM-CU, las células de seis donantes se mantuvieron en cultivo durante 7 pases en presencia de DMEM suplementado con 10% de hPL. Se usaron medios suplementados con FBS, 10% como control. Los niveles de duplicación de la población (PDL) para cada pasaje se calcularon utilizando la fórmula X = [log10 (NH) -log10 (NI)] / log10 (2), donde NI es el número de inóculo y NH es el número de células cosechadas. El aumento de la duplicación de la población también se calculó agregando el nivel de PDL para cada pasaje a fin de obtener la duplicación de la población acumulada (CPD). No se encontraron diferencias significativas en el PDL y los valores de CPD en CEM cultivadas expuestas a hPL obtenido de los grupos A+, B+, O- y O+ (**FIG. 1C y 1D**). Además, se encontró una cinética estable de crecimiento celular en todos los pasajes evaluados, con un promedio de PDL de 3,2. En contraste, las células cultivadas en medios suplementados con FBS exhibieron valores de PDL significativamente más bajos. Finalmente, las tasas de proliferación celular más altas y más estables de CEM expuestas al medio de cultivo suplementado con hPL dieron como resultado valores de CPD más altos en comparación con MSC cultivadas en medios FBS ($p < 0.05$).

Se evaluó la presencia de varios factores estimuladores de inmunomodulación contenidos en diversos lotes de hPL, comparando factores estimuladores de inmunomodulación, citoquinas inflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento y su consumo por parte de las CEM-CU. En general, los lotes de hPL evaluados mostraron un efecto homogéneo en la estimulación de la proliferación de CEM-WJ y un contenido homogéneo de factores de crecimiento y citoquinas, al compararlos con FBS (**FIG. 2A**). Los diversos lotes de hPL contenían niveles superiores de FGFb, CCL5, EGF, MIF y TGF con respecto al suplemento estándar y fueron activamente consumidos por las CEM-CU durante un periodo de cultivo de 5 días (**FIG. 2B**). De manera relevante, la presencia de hPL pero no de suplemento

estándar indujo la expresión significativa de HGF, GM-CSG, IGFBP-1 e IGFBP-2, factores que han sido reconocidos como potentes inmunomoduladores (**FIG. 2C**).

Las CEM-CU se cosecharon y se resuspendieron en una concentración final de $1x10^6$ células / ml. Las células se transfirieron a 1000 µl de medio preenfriado, que contenía DMEM y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) suplementado con 30% de hPL (n = 22) o 30% de FBS (n = 22). Para cada grupo, las células se crioconservaron usando un congelador de velocidad controlada CryoMed a una velocidad de congelación de 1ºC por minuto o colocando crioviales en estantes de isopropanol preenfriados (Mr. Frosty, Nalgene®) y transfiriéndolos al congelador a -80 ° C 24 h antes del almacenamiento final en nitrógeno líquido (LN_2). Las muestras de células se almacenaron durante un mes hasta la descongelación. Para evaluar la viabilidad y la recuperación, las CEM-CU se descongelaron y lavaron. Las células viables y muertas se contaron con una cámara Neubauer después de teñir con azul de tripano (0,4%, Life Technologies). Las células se sembraron adicionalmente en matraces de cultivo de tejidos de 25 cm^2 (Corning, EE. UU.) en una densidad de $4,6x10^3$ células / cm^2 y se sembraron hasta la confluencia para obtener valores de PDL, CPD y PDT después del descongelamiento. Adicionalmente, las CEM-CU fueron caracterizadas en su potencial de diferenciación hacia linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (**FIG. 5A**). La expresión de antígenos de superficie celular relacionados con CEM se evaluó mediante citometría de flujo utilizando los marcadores de membrana CD90 (APC), CD73 (PECy7), CD105 (PE), CD45 (APC / Cy7), CD34 (PerCP-Cy5.5), HLA -DR (Azul Pacífico) y HLA-ABC (FITC). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 ° C, se centrifugaron a 300 g durante 6 minutos y se resuspendieron en 0,2 ml de PBS. El procedimiento se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.) y los datos se analizaron con el paquete de software de análisis de datos FlowJo vX.7.0 (TreeStar, EE. UU.). Así mismo se evaluó el fenotipo de CEM-CU aisladas de diferentes donantes, a partir de la identificación del fenotipo de identidad mesenquimal evaluado por la positividad de los marcadores CD73, CD90, CD105 y negatividad de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, HLA-DR y CD31 (**FIG. 5B**). Finalmente se pudo demostrar un incremento en la expresión del marcador de inmunomodulación CD274 (70-90%) en CEM-CU expandidas en presencia de hLP.

Efecto inmunomodulador de las CEM-CU

Se evaluaron cocultivos directos (contacto de célula a célula) e indirectos (transwell). Las PBMC se descongelaron y se cultivaron durante 24 horas. Posteriormente, las PBMC se estimularon con 1 µg / ml de fitohemaglutinina (PHA) anti-CD2, -CD3, -CD28 (αCD3 / CD28) perlas de activación de células T (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). CEM-CU, de hasta 6 pasajes se ajustaron a $5x10^4$ células / pocillo en una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 5 horas. Después de este tiempo, se retiró el medio de CEM-CU y se añadieron $5x10^5$ células PBMC en RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Las placas se incubaron durante 120 horas a 37 °C con 5% de CO_2. Para cocultivos indirectos, se sembraron CEM-CU en el fondo del pozo y PBMC estimuladas en la parte superior de los insertos transwell (tamaño de poro de 1 µm). Cada ensayo se repitió tres veces y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80 °C para ensayos posteriores de citoquinas. El efecto inhibitorio de CEM-CU sobre la proliferación de linfocitos se midió mediante recuentos positivos de CD3 usando cuentas de conteo absoluto CountBright (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). El número de células por microlitro se calculó en función del número de células contadas x concentración de perlas / número de perlas contadas. Después de la incubación, se observó supresión de aproximadamente 90% de linfocitos CD3+ activados con PHA en contacto dependiente e independiente con CEM-CU (**FIG. 3**). La presencia de CEM-CU indujo supresión significativa de CMN activadas por anti-CD3/CD28, en contacto celular dependiente e independiente.

Ejemplo 2. Caracterización de factores inmunomoduladores expresados por CEM

La concentración de citoquinas, quimiocinas y factores estimuladores de inmunomodulación en los sobrenadantes celulares de CEM-CU en estado de inmunomodulación se evaluó mediante la tecnología de ensayo de microesferas por citometría de flujo. Las citoquinas (GM-CSF, IL-1 α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, LPS, IL-2, IL-2R, IL-7, IL-12, IL-15 e IL-17), citoquinas antiinflamatorias (IL-1RA, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN-α), quimiocinas (eotaxina, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1α, MIP-1β y RANTES), factores estimuladores de

inmunomodulación angiogénicos (VEGF) y factores estimuladores de inmunomodulación (EGF, HGF, bFGF, G-CSF) se determinaron mediante el ensayo *Cytokine 30-Plex Human Panel* de Invitrogen™ (Carlsbad, California, EE. UU.). El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la concentración se informó en pg/ml. Entre los principales factores liberados por las CEM-CU durante inmunomodulación, se detectó el incremento significativo de G-CSF, MCP-1, IL-6, IL-10 e IP-10 (**FIG. 4**). Este perfil de expresión de factores inmunomoduladores fue similar cuando las CMN fueron estimuladas con PHA o αCD3/CD28. Igualmente, este perfil secretorio identificado se presentó en CEM-CU que estuvieron en contacto directo con CMN o en contacto independiente (transwell). Adicionalmente a partir de análisis de transcriptoma en CEM-CU en estado de inmunomodulación (expuestas a CMN activadas con PHA), se identificó la expresión diferencial de 6.077 genes (**FIG. 3C y 3D**). De ellos, un grupo de genes seleccionados que corresponden a señales de inducción de procesos de inmunomodulación, se encontraron significativamente activados en CEM-CU durante inmunomodulación (C2, **FIG. 3E**)

Ejemplo 3. Precondicionamiento de CEM-CU con citoquinas inducen señales inmunomoduladoras

El contenido de citoquinas y factores estimuladores de inmunomodulación de diferentes preparaciones de hPL se determinó mediante arreglos cuantitativos de citoquinas utilizando el ensayo comercial Luminex Human Cytokine 30-plex (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el fenotipado de identidad y funcional de CEM-CU, las células se cultivaron y se estimularon a diferentes condiciones tales como PHA, αCD3 / CD28 o cóctel de citoquinas que consiste en IL-1b (50ng / mL) y TNF-a (50ng / mL) o PBMNC activadas y se evaluó la expresión de PDL-1, PDL-2, CD80 y CD86. Para todos los análisis de citometría de flujo, se incluyó el control de isotipo. Se usó el instrumento FACSCanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.) y el conjunto de datos se analizó utilizando el paquete de software de análisis de datos FlowJo vX.7.0 (TreeStar, EE. UU.). CEM-CU de diferentes donantes expuestas a citoquinas inflamatorias indujeron la expresión de CD25 (IL2R soluble) así como la expresión de PD-L1 y PD-L2 48 horas

posterior a la incubación (**FIG. 4**), indicando la inducción de un fenotipo altamente inmunomodulador a través del precondicionamiento celular por incubación con citoquinas.

Ejemplo 4. Exposición de CEM-CU a leucocitos inmunoactivados

Previamente se demostró que la población de CEM-CU expandida por el método desarrollado en esta invención se encuentra altamente enriquecida con células con potente fenotipo inmunomodulador que por sí mismas ejercen un efecto supresor sobre la proliferación de linfocitos activados. Adicionalmente, la evidencia acumulada durante el desarrollo del método de acuerdo con la presente invención, sugiere que la inmuno activación de leucocitos y posterior exposición a CEM-CU induce una respuesta supresora significativamente aumentada por parte de estas células estromales.

De acuerdo con lo anterior, el precondicionamiento de CEM-CU puede realizarse mediante la exposición de CEM-CU a leucocitos inmunoactivados previo a la formulación final, liberación y aplicación clínica del producto medicinal.

Los leucocitos inmunoactivados de acuerdo con la presente divulgación pueden obtenerse de una muestra de sangre periférica del paciente (mínimo 10 mL), 48-72 horas previas a la infusión celular. Dicha muestra es seguidamente transferida al laboratorio de producción celular. De esta muestra de sangre se obtendrán alrededor de 0,7-1 x 10^7 PBMCs que son inmediatamente activados con anticuerpos αCD3/CD28 para inducir linfoproliferación e inducción de citoquinas inflamatorias. Las PBMCs se incuban durante 24 horas con fitohemaglutinina o anticuerpos dirigidos contra el receptor CD3 de los linfocitos para inmunoactivar el componente linfocitario y mononuclear, y luego son transferidas a la suspensión celular de CEM-CU del banco maestro celular, seguida por una incubación adicional por 24 horas hasta su formulación final.

Finalmente, este producto basado en la suspensión celular de CEM-CU/PBMC-activados será liberado y transferido al servicio clínico.

Ejemplo 5. Composición de un producto medicinal de terapia avanzada basada en CEM-CU inmunomoduladoras

El producto celular aquí desarrollado surge de un proceso de expansión debidamente controlado y monitoreado para asegurar homogeneidad del producto. El proceso de producción incluye la generación de un banco maestro celular y la posterior expansión de este banco en dosis individuales de CEM inmunomoduladoras de 20-40 millones de células por unidad, criopreservados a -190 ºC

El producto medicinal personalizado basado en una estrategia de pre-condicionamiento con citoquinas inflamatorias consiste en una alícuota del banco celular maestro de CEM-CU, cuya suspensión celular se transfiere a un frasco de cultivo e inmediatamente se expone en cultivo a una mezcla de proteínas recombinantes correspondientes a los factores inflamatorios seleccionados entre los cuales se encuentran IL-1α y/o IL-1β en combinación con TNFα a concentraciones entre 10-50 ng/mL volumen final o leucocitos inmunoactivados de una muestra de sangre periférica del paciente. El producto de CEM-CU tratado con factores inflamatorios se incuba hasta por 24 horas. . Para el proceso de formulación final y liberación para uso clínico, el producto es resuspendido, dosificado en un formato que puede ser una jeringa de 10 mL para aplicación local o una bolsa de 100-200 mL de volumen para aplicación sistémica que es enviada a la unidad clínica. Esta suspensión celular, debidamente caracterizada en términos de pureza, viabilidad, potencia e identidad se encuentra contenida en una solución cristaloide tipo que contiene diferentes electrolitos, en los que se incluyen, sin limitarse a iones de sodio (140 mmol/l), potasio (5 mmol/l), magnesio (1.5 mmol/l), cloro (98 mmol/l), acetato (27 mmol/l) y gluconato (23 mmol/l) y una adición de 2-5 % de albúmina humana.

Es importante mencionar que la estrategia de estimulación de CEM-CU con leucocitos inmunoactivados según lo mencionado en el Ejemplo 4 no genera un riesgo de reacciones alogénicas adicionales derivado de la transferencia de leucocitos (especialmente poblaciones linfocitarias) en el receptor, debido a que la población de PBMCs es autóloga. Adicionalmente, de acuerdo a lo observado experimentalmente, estos leucocitos se

encuentran en un total estado de inhibición resultante del efecto inmunosupresor de las células mesenquimales incluidas en el producto medicinal.

Ejemplo 6. Aplicación de la composición de CEM-CU inmunomoduladoras, usos y métodos terapéuticos

La aplicación clínica de productos medicinales de terapia avanzada basadas en CEM viene incrementándose en distintos escenarios clínicos con diversos grados de eficacia terapéutica de acuerdo a la patología a la que se dirige y la fuente celular seleccionada. Principalmente las CEM-CU han sido introducidas recientemente para el manejo terapéutico de enfermedad injerto contra huésped (EICH), en particular post-trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas. Adicionalmente existe experiencia clínica acumulada en algunas condiciones autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple. En estas condiciones, el producto celular de CEM-CU es administrado vía intravenosa por punción venosa y por tanto su aplicación es considerada de uso "sistémico". En cuanto a la dosis de administración, si bien son limitadas las aplicaciones clínicas acumuladas, en general se considera una dosis de 2-5 x 10^6 células por kilogramo de peso del paciente tratado, por dosis. En el caso de EICH, la suspensión celular se ha administrado con una frecuencia de una dosis por mes, con un total de dosis de 4-6 dosis, sin embargo el régimen de tratamiento debe adaptarse a la condición y al resultado esperado. En cuanto al escenario en enfermedad autoinmune, el régimen de tratamiento es similar en términos de dosis, frecuencia y dosis total. En términos generales, el uso de CEM ha demostrado alta seguridad en términos de tolerancia adecuada a la administración y ausencia de efectos adverso severos o graves.

Otra aplicación clínica prometedora de las CEM tiene que ver con su uso en el tratamiento de artrosis y osteoartrosis, principalmente de rodilla y cadera. En estos escenarios clínicos, la mayor eficacia observada está asociada a su aplicación local, directamente en el sitio de la lesión (principalmente inyección intraarticular). Para este tipo de aplicación, la suspensión celular se formula en presentación final como inyección, para aplicación inmediata (no mayor a 12 horas post-liberación). En este caso, el régimen de aplicación consiste en inyecciones

intraarticulares de 10-20 x 10^6 células por inyección. Se han reportado de 1 hasta 4 inyecciones por año, espaciadas entre 3 y 12 meses por aplicación. Nuevamente, el uso local de productos de terapia celular basados en CEM no han resultado en efectos adversos severos/graves con este tipo de aplicación y su eficacia clínica es positiva.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una población de células estromales mesenquimales (CEM) inmunomoduladoras, que comprende las etapas de:

a) cultivar y expandir CEM en un medio de cultivo con un suplemento de factores estimuladores de inmunomodulación; y opcionalmente,

b) adicionar citoquinas o exponer a leucocitos autólogos inmunoactivados.

2. El método de la Reivindicación 1, en donde el suplemento de factores estimuladores de inmunomodulación comprende lisado de plaquetas humano entre el 5 y el 10 % v/v del medio de cultivo.

3. El método de la Reivindicación 1, en donde en la etapa b) las citoquinas se seleccionan del grupo que consiste en IL1 alfa, IL1 beta, TNF alfa, IFN-gamma, LPS o mezclas de las mismas.

4. El método de la Reivindicación 1, en donde la etapa b) tiene una duración entre 24 y 120 horas.

5. El método de la Reivindicación 1, en donde en la etapa b), las CEM expresan factores inmunomoduladores seleccionados del grupo que consiste en HGF, CD25, CD273, CD274, TIM-1, CD131, G-CSF, GM-CSF, IL-10- IL-6, MIG, MCP-1 y IP-10.

6. Una composición farmacéutica que comprende:

una población de células estromales mesenquimales (CEM) inmunomoduladoras obtenidas mediante el método de la Reivindicación 1;

factores inmunomoduladores; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición de la Reivindicación 6, en donde los factores inmunomoduladores se seleccionan del grupo que consiste en: receptor soluble de HGF, CD25, CD273, CD274,

TIM-1, CD131, G-CSF, GM-CSF, IL-10- IL-6, MIG, MCP-1, IP-10 y mezclas de los mismos.

8. La composición de la Reivindicación 7, en donde los factores inmunomoduladores son expresados por las CEM.

9. Un método de tratamiento de una condición de naturaleza autoinmune o asociada con inflamación aguda o crónica, en donde el método consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la Reivindicación 6 a un paciente que lo necesita.

10. El método de la Reivindicación 9, en donde la condición autoinmune o asociada con inflamación aguda o crónica se selecciona del grupo que consiste en osteoartrosis de rodilla, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, esclerodermia, enfermedad injerto contra huésped, entre otras.

****

RESUMEN

La presente invención se refiere a un método de estimulación de células estromales mesenquimales para inducir la expresión de factores inmunomoduladores y una composición farmacéutica que comprende una población de células estromales mesenquimales obtenidas mediante dicho método. La invención también se refiere a las aplicaciones de dicha composición farmacéutica en condiciones de naturaleza autoinmune o asociadas con inflamación aguda o crónica.

****