



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

“Células Madre Mesenquimales
de Médula Ósea Fucosiladas.
¿Es Posible una
Producción a Escala Clínica?”

D^a. María Dolores López Lucas

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**“CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA
ÓSEA FUCOSILADAS. ¿ES POSIBLE UNA
PRODUCCIÓN A ESCALA CLÍNICA?”**

Doctorando: María Dolores López Lucas.

Directores: Dr. José María Moraleda Jiménez.

Dra. Ana María García Hernández.

Dr. Gregorio Castellanos Escrig.

Murcia 2015

A mi tío.

AGRADECIMIENTOS:

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. Intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esa etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

En primer lugar mi agradecimiento va dirigido a mis directores, que han hecho posible la realización de esta tesis.

A continuación quiero agradecer a cada una de las personas que han contribuido a mi crecimiento tanto científico como personal a lo largo de estos años.

Debo comenzar por tanto por mi estancia en el Departamento de Cirugía Experimental. En este sentido mi más sincera gratitud a mis compañeros por su compañía y sabios consejos y por haber despertado en mí esta inquietud por la investigación, muchas gracias a María, Alberto, Beatriz, Carlos, Olga, Ana, Mónica, Paqui, María Luisa, Pablo, Mari Carmen, Tere y Rut.

Realmente fue mi incorporación en el Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) la que me hizo ver la importancia de la investigación y su traslación a la clínica. En Criobiología, de la mano de la Dra. Maruja Majado, Pilar y Viqui, aprendí a trabajar con disciplina y rigor.

Mi primera toma de contacto con la Terapia Celular, la envergadura de la investigación básica y su finalidad en la aplicación clínica vinieron de la mano de Miguel Blanquer. Gracias Miguel por tener siempre tiempo para mí.

La etapa básica de elaboración de este trabajo tuvo lugar con mis compañeros del CEIB: Esther, Carlos, David, Noemí, José Eduardo, Paola,... muchas gracias a todos ellos por su ayuda.

Mi más sincera gratitud al Profesor Robert Sackstein, cuya colaboración ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto transmitiéndome su motivación y sus conocimientos. Gracias a mis compañeros del Departamento de Dermatología del Brigham and Women's Hospital de Boston que hicieron que mi estancia allí fuera provechosa: Brad, Conor, Jack, Mariana, Ritika y por último Gisela, a quien tengo que agradecer especialmente su dedicación y amistad.

Gracias también a todos los servicios del HCUVA que han mostrado su apoyo a este proyecto (Biobanco, Anatomía Patológica, Microbiología, Radiología Intervencionista, Reumatología...).

A la Red de Terapia Celular y en especial a Javier por ofrecerme la posibilidad de participar en las reuniones y eventos científicos y solucionar siempre mis problemas "tecnológicos" entre otros.

A la Unidad de Ensayos Clínicos de Terapia Celular: Natalia, Sergio, Mónica, Virginia, por su ayuda y por hacer que el trabajo además de productivo sea divertido.

A todos mis compañeros del Servicio de Hematología que siempre me han apoyado y me acogieron desde el principio como una más: Joaquín, Valen, Mercedes, Raul, Francesca, Fernanda, Toñi, Alina, María, Amelia, Jorge, Eduardo, Faustino, Antonio, Consuelo, Pedro, Andrés, Concha y al resto de personas que forman el servicio.

Al personal de la Unidad de Producción Celular del HCUVA: Darío, Carmen, Cira, Mar y Sandra, con quien he pasado más horas que con mi propia familia compartiendo malos y buenos momentos que finalmente hemos superado y se han visto fructificados en este proyecto. Gracias de todo corazón, esto no hubiera sido posible sin vosotros.

A mi directora la Dra. Ana M^a García Hernández, por su constante apoyo, dedicación, asesoramiento y por su amistad. Porque me ha hecho creer en mí misma haciéndoselo ver también a los demás. Este trabajo sin duda no hubiera sido posible sin tu ayuda Ana.

Al Dr. José María Moraleda Jiménez, mi jefe, mi director, y la persona que me ha dado la oportunidad de conocer la Terapia Celular recordándome que nuestro principal objetivo por encima de todo era el paciente. Gracias por confiar en mí siempre.

Especialmente quisiera mostrar mi gratitud y más sincero cariño a Paqui, por su desinteresada ayuda en todo momento, intentando dar solución a todos los problemas que me han ido surgiendo. Gracias por ser un ejemplo para todos de honestidad, compañerismo, esfuerzo y dedicación. Gracias por TODO.

Este trabajo, que se engloba en la línea de investigación "Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular" del grupo de Investigación multidisciplinar [GI/IMIB/C061/2011] del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria, ha sido realizado con la ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI12/00760) y de la Red Española de Terapia Celular (RD12/0019/0001) del Instituto de Salud Carlos III.

Finalmente, todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, especialmente de mi madre en quien siempre veré un ejemplo de lucha y superación, enseñándome que la vida es para los valientes. Gracias de todo corazón, esta tesis es también vuestro premio.

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

1. CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES.....	1
1.1. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TRONCALES	3
1.2. ORIGEN DE LAS CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CSM)	5
1.3. CARACTERISTICAS DE LAS CSM.....	6
1.3.1. Morfología	6
1.3.2. Fenotipo	7
1.3.3. Potencial de Diferenciación	8
1.4. TEJIDOS FUENTE DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES	10
1.5. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES	11
1.5.1. Propiedades tróficas	11
1.5.2. Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de CSM.....	11
1.5.3. Propiedades anti-apoptóticas.....	13
1.5.4. Propiedades antimicrobianas	14
1.6. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA	14
2. MIGRACION Y “HOMING”	15
2.1. MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL	16
2.2. SELECTINAS.....	17
2.3. RECEPTORES DE E-SELECTINA EN LAS CÉLULAS CIRCULANTES	18
3. FUCOSILACIÓN	20
3.1. GLICOSILTRANSFERASAS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN SLEX	20
3.2. EXOGLICOSILACIÓN DE SUPERFICIES CELULARES: CRONOLOGÍA Y RESTRICCIONES	22
3.3. DESARROLLO DE GPS Y PRUEBAS DE SU EFICACIA EN EL TRÁFICO CELULAR	24
3.4. GPS: REVISIÓN DEL PARADIGMA EN MÚLTIPLES PASOS E IMPLICACIÓN EN LA TERAPIA CELULAR	25
4. TERAPIAS AVANZADAS	28
4.1. DEFINICIONES	28
4.1.1. Medicamento de terapia génica	28
4.1.2. Medicamento de terapia celular	29
4.1.3. Medicamento de Ingeniería de tejidos.....	29
4.1.4. Medicamento combinado de terapia avanzada	30

4.2. MEDICAMENTOS DE TERAPIA CELULAR.....	30
4.2.1. Producción.....	30
4.2.2. Instalaciones.....	31
4.2.3. Personal.....	33
4.2.4. Validación del proceso productivo.....	34
4.2.5. Simulación del proceso aséptico: Media fill.....	36
5. PRODUCCIÓN DE CELULAS STEM MESENQUIMALES PARA USO CLINICO.....	37
5.1. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE CSM	37
5.2. REQUERIMIENTOS DE CALIDAD PARA EL USO CLÍNICO DE CSM	39
5.2.1. Aislamiento y expansión de CSM	39
5.2.2. Controles de Calidad para la validación de la Producción de CSM	39
5.2.2.1. IDENTIDAD	40
5.2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO	40
5.2.2.3. ESTERILIDAD.....	41
5.2.2.4. TUMORIGÉNESIS	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO	45
OBJETIVOS.....	46
OBJETIVO GLOBAL.....	46
OBJETIVOS ESPECIFICOS	46
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO Y FUCOSILACIÓN DE CSM-MO CULTIVADAS SIN EMPLEO DE DERIVADOS ANIMALES.....	49
1.1. OBTENCIÓN DE LISADO PLAQUETARIO.....	49
1.2. AISLAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CSM DE MO HUMANAS SUSTITUYENDO EL SUERO BOVINO FETAL POR LISADO PLAQUETARIO Y LA TRIPSINA POR TRYPLE SELECT.	49
1.2.1. Obtención de muestras de MO.	49
1.2.2. Aislamiento de células mononucleadas.	50
1.2.3. Cultivo y expansión de células madre mesenquimales.....	51
1.3. FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANAS.	52
1.4. VERIFICACIÓN DE LA FUCOSILACIÓN: ESTUDIO COMPARATIVO.	52
1.4.1. Cultivo de líneas celulares control.	52
1.4.2. Análisis inmunofenotípico (verificación por citometría de flujo).....	52
1.4.3. Análisis molecular: electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot	52

1.4.3.1. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA	53
1.4.3.2. SDS-PAGE.....	53
1.4.3.3. ELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS: WESTERN BLOT	53
1.4.3.4. INMUNODETECCIÓN	53
1.4.4. Análisis funcional: “Stamper Woodruff Assay”	54
2. DOCUMENTACION	56
3. SIMULACIÓN DEL PROCESO ASÉPTICO MEDIA FILL	58
3.1. ENSAYOS Y CRITERIO DE ACEPTACIÓN.....	58
3.2. TEST DE IDONEIDAD DEL MEDIO EMPLEADO EN EL MEDIA FILL.....	59
3.2.1. Reconstitución de las cepas.....	59
3.2.2. Inoculación de los tubos de BHI.....	60
4. VALIDACIÓN PROSPECTIVA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN	60
5. CONTROLES DE CALIDAD DEL MEDICAMENTO DURANTE EL PROCESO DE FABRICACIÓN	63
5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO	63
5.2. CONTROLES MICROBIOLÓGICOS	63
5.2.1. Detección de Mycoplasma	63
5.2.1.1. MATERIALES Y EQUIPOS.....	63
5.2.1.2. DESARROLLO	64
5.2.2. Controles microbiológicos/Test de esterilidad mediante sistema BacTAlert.....	64
5.2.2.2. PROCESAMIENTO	65
5.2.3. Test de Gram urgente	65
5.2.3.1. PROCESAMIENTO	66
5.2.4. Nivel de endotoxinas	66
5.2.4.1. MATERIALES	66
5.2.4.2. DESARROLLO	67
5.3. RECUENTO Y VIABILIDAD.....	68
5.3.1. Materiales y equipos.....	68
5.3.2. Desarrollo.....	69
5.3.2.1. RECUENTO EN “HAEMATO COULTER”	69
5.3.2.2. RECUENTO Y VIABILIDAD DE CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS CELULARES	69
5.4. CONTROL DEL CRECIMIENTO.....	70
5.5 INMUNOFENOTIPO CSM	70
5.5.1. Materiales.....	70
5.5.2. Procedimiento	71

5.5.3. Adquisición y análisis de las muestras:	72
5.6. ESTABILIDAD CROMOSÓMICA: CARIOTIPO	73
5.7. NIVEL DE EXPRESIÓN C-MYC	73
5.8. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN	73
5.8.1. Diferenciación osteogénica.....	73
5.8.2. Diferenciación adipogénica.....	74
5.8.3. Diferenciación condrogénica	74
5.9. VERIFICACIÓN FUCOSILACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	75
5.9.1. Materiales y equipos.....	75
5.9.2. Desarrollo.....	76
5.9.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	76
5.9.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	76
5.9.2.3. ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA	76
5.9.2.4. ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....	77
5.10. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO	79
5.10.1. Materiales y equipos.....	79
5.10.2. Descripción del método	79
RESULTADOS.....	83
1. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO Y LA FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA SIN UTILIZACIÓN DE REACTIVOS ANIMALES. .	85
1.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO	85
1.2. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE HCELL POR WESTERN BLOT	87
1.3. RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD: <i>STAMPER WOODRUFF ASSAY</i>	88
2. RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DEL SISTEMA DOCUMENTAL.	91
2.1. EJEMPLO DE PNT: “CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA” (PNT-P-011.02).....	93
2.1.1. Objetivo	93
2.1.2. Ámbito de aplicación.....	93
2.1.3. Responsabilidades.....	93
2.1.4. Materiales y equipos	93
2.1.5. Desarrollo	94
2.1.6. Referencias	96
2.1.7. Historial de revisiones	97
2.1.8. Registros	97

2.1.9. Anexos.....	97
2.2. EJEMPLO REG:“REGISTRO DE LA OBTENCIÓN DE MO COMO MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA” (REG-PNT-P-012-01.02).	98
2.3. EJEMPLO DE ESPECIFICACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA (MÉDULA ÓSEA HUMANA) (SP-CC-001.03).	98
2.4. EJEMPLO DE GFL DE FUCOSILACIÓN DE CSM-MO ADULTAS EXPANDIDAS (GFL-008.01).	99
3. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA ESTERILIDAD DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN (MEDIA FILL).	100
3.1. RESULTADOS DEL TEST DE IDONEIDAD	100
3.1.1. Promoción del crecimiento Pre-simulación.....	102
3.1.2. Promoción del crecimiento Post-simulación	102
3.2. INFORME VALIDACIÓN DEL PROCESO ASÉPTICO (MEDIA FILL) CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TROCALES ADULTAS AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSEA.....	103
4. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CSM-MO FUCOSILADAS.	104
4.1. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE MO HUMANA.	104
4.2. Obtención de la fracción mononucleada de MO con procesador Sepax	106
4.3. RESULTADOS DEL CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CSM-MO	108
4.4. RESULTADOS DE LA FUCOSILACIÓN DE CSM-MO	109
4.4.1. Resultados de los controles microbiológicos en producto final.	109
4.4.2. Resultados de Inmunofenotipo	110
4.4.3. Resultados de Viabilidad postfucosilación.....	115
4.4.4. Resultados de los estudios de tumorigénesis.....	117
4.4.4.1. CARIOTIPO	117
4.4.4.2. C-MYC	117
4.4.5. Resultados de Diferenciación	118
4.4.6. Resultados de estabilidad.	120
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES.....	139
REFERENCIAS	141
ANEXOS.....	171
Anexo I: Solicitud de asesoramiento científico a la AEMPS sobre un cambio de reactivo para la producción del medicamento en investigación	173
Anexo II: Hoja de información para la donación voluntaria de MO para investigación biomédica	181

Anexo III: Harvest de médula osea 186

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AKT: Protein-quinasa B

APC: Aloficocianina.

BCIP: *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.*

BCR: Banco Celular de Reserva

BHI: *Brain Heart Infusion.*

BSA: *Bovine Serum Albumina.*

cdNA: ADN complementario o ADN copia.

CFU-F: Unidad formadora de colonias fibroblásticas.

CMN: Células mononucleadas.

CMN-MO: Células mononucleadas de médula ósea.

CSM: Células troncales mesenquimales adultas.

CSM-MOFUC: células troncales mesenquimales adultas de médula ósea expandidas fucosiladas.

CPD: Número de duplicaciones acumuladas.

CTE: Células Troncales Somáticas.

CTM: Células Troncales Mesenquimales.

CTS: Células Troncales Embrionarias.

DGBS: *Density gradient based separation.*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium.*

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetra-acético.

FA: Fosfatasa alcalina.

FITC: Isocianato de fluoresceína.

FT: Fucosiltransferasa

GFL: Guía de Fabricación de Lote

GMP: Good Manufacturing Practice.

GPS: Glycosyltransferase-Programmed Stereosubstitution

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

IMPD: Investigation Medicinal Product Dossier

IPA: Alcohol isopropilo.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cell Therapy*).

LP: lisado plaquetario.

LPAM-1: integrina $\alpha_4\beta_7$.

mAbs: Anticuerpos monoclonales.

ABREVIATURAS

Mn: Manganese.

MO: Medula ósea.

MR-BCR: Muestra de referencia del BCR.

MSC: Mesenchymal Stem Cell.

NBT: Nitroblue tetrazolium.

NCF: Normas de correcta fabricación.

NOD/SCID: Non-Obese Diabetic and Severe Combined Immunodeficiency

PBS: Phosphate Buffered Saline

PE: Ficoeritrina.

PerCP: Proteína Clorofila Peridina.

PNT: Procedimiento Normalizado de Trabajo.

SAS: Safety Airlock System.

SBF: Suero bovino fetal.

SSC: Puerto para toma de muestras estéril (*Sampling Site Coupler*).

TBS: *Tris Buffer Solution*.

TSA3: *Trypcase Soy 3P Agar*.

TTBS: *Tris-Buffered Solution* con Tween 20

UPC: Unidad de Producción Celular.

UV: Ultra-Violeta.

Figura 1. Origen de las células madre.	3
Figura 2. Células troncales somáticas..	4
Figura 3. Imagen de microscopia de contraste de fases de CSM de sangre periférica.....	6
Figura 4. Diferenciación mesodérmica de las CSM. Modificado de Montesinos JJ y Castro ME 2011.....	8
Figura 5. Proceso de migración de un leucocito del torrente sanguíneo hacia un foco inflamatorio.....	17
Figura 6. Estructuras de lactosamina Tipo 1 y Tipo 2 y de sLea y sLex.	19
Figura 7. Síntesis endógena del ligando de E y L-selectina en células hematopoyéticas frente a la síntesis exógena de HCELL por Estereosustitución programada con glicosiltransferasas (GPS). ..	21
Figura 8. Componentes moleculares de las células madre hematopoyéticas humanas y de las CSM en la interacción con el endotelio de la microvasculatura ósea.....	24
Figura 9. Representación esquemática de los múltiples pasos en la migración celular desde el compartimento vascular a los compartimentos extravasculares.	27
Figura 10. Representación esquemática de los pasos en la migración celular de las células circulantes que expresan HCELL junto con VLA-4 cuando se encuentran en zonas endoteliales que expresan E-selectina y VCAM-1.....	27
Figura 11. Esquema de obtención de la fracción mononuclear de médula ósea con gradiente de ficoll.	50
Figura 12. Procesamiento de las extensiones de CSM por Cytospin.	55
Figura 13. Incubación de CSM con solución de linfocitos de sangre periférica	56
Figura 14. Flujograma de fabricación del medicamento CSM-MOFUC.....	61
Figura 15. Imagen de los cartuchos utilizados para medición de nivel de endotoxinas.....	67
Figura 16. Inoculación de los cartuchos ENDOSAFE con la muestra a estudio.	68
Figura 17. Programa para adquisición de muestras Navios.	72
Figura 18. Niveles de expresión de HECA452 en las líneas control.	85
Figura 19. Histograma de expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con SBF tras el tratamiento con FTVI.....	86
Figura 20. Histograma de expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con LP tras el tratamiento con FTVI.....	86
Figura 21. Análisis comparativo por citometría de flujo de la expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con SBF y LP tras exofucosilación.....	87
Figura 22. Western Blot de KG1a y CSM-MOFUC con suero bovino fetal (SBF) y lisado plaquetario (LP).....	88
Figura 23. Esquema del ensayo Stamper-Woodruff. Tomado de Sackstein 2012.	89
Figura 24. Preparación con CSM-MO cultivadas con lisado plaquetario tras incubarse con linfocitos de sangre periférica.	90
Figura 25. Preparación con CSM-MO fucosiladas tras incubarse con linfocitos de sangre periférica. Puede observarse la adhesión de linfocitos refringentes a las CSM.	90
Figura 26. Esquema ilustrativo del procedimiento de llenado de la factoría de cultivo.....	96

Figura 27. Registro de obtención del material biológico de partida (MO) asociado al PNT-P-012.	98
Figura 28. Especificación de la médula ósea humana como material biológico de partida.	99
Figura 29. Guía de fabricación de lote de fucosilación de células mesenquimales troncales adultas de MO expandidas.	99
Figura 30. Turbidez del medio BHI por crecimiento de las distintas cepas inoculadas.	101
Figura 31. Crecimiento en placas de Agar Sangre de las cepas utilizadas para el test de idoneidad del BHI.	101
Figura 32. Kit de obtención del material biológico de partida (MO).	105
Figura 33. Harvest de médula ósea.	105
Figura 34. Preparación del kit de obtención de la fracción mononucleada en el procesador celular Sepax.	106
Figura 35. Colocación del kit del Sepax. Bolsa de MO a la izquierda y la de seroalbúmina a la derecha.	107
Figura 36. Bolsa de producto del Sepax con células mononucleadas en su interior.	107
Figura 37. Técnico de producción abriendo la puerta del SAS para recoger la bolsa de CMN. ..	108
Figura 38. Imágenes de las CSM-MOFUC de todos los lotes en el pase previo a la fucosilación.	109
Figura 39. Gráfico Inmunofenotípico de los lotes de validación.	110
Figura 40. A) Histograma de expresión de HECA452 en KG1a. En verde se muestra el control isotípico. B) Histograma de expresión de HECA452 en la línea RPMI8402.	111
Figura 41. Histograma de expresión de marcadores. Porcentaje de expresión de HECA452 en los distintos lotes de validación.	111
Figura 42. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/001.	112
Figura 43. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote BRC-V/001.	112
Figura 44. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/002.	113
Figura 45. Grafico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/003.	113
Figura 46. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/Fc humano en la línea RPMI8402.	114
Figura 47. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/001.	114
Figura 48. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/002.	115
Figura 49. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/003.	115
Figura 50. Gráficos de puntos biparamétricos que muestran la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio de los cuatro lotes de validación de CSM-MO expandidas fucosiladas.	116

Figura 51. Cariotipo en fase 2 del lote CSM-MOFUC-V/001.117	Figura 52. Evaluación de la diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar NBT/BCIP en uno de los lotes de validación..	118
Figura 53. Evaluación de la diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar Alizarin Red en uno de los lotes de validación..		119
Figura 54. Evaluación de la diferenciación adipogénica en CSM tras aplicar Oil Red en uno de los lotes de validación..		119
Figura 55. Condrocitos tras cultivo de CSM fucosiladas en medio NH Chondrodif (Azul alcian).		120
Figura 56. Histograma de expresión de marcadores positivos de identidad mesenquimal CD90 (fila de arriba), CD73 (fila del centro) y CD105 (fila de abajo) medidos en tres muestras distintas de células troncales mesenquimales de médula ósea expandidas y fucosiladas con FTVII según protocolo normalizado a las 0 horas (rojo), 24 horas (verde claro) y 48 horas (verde oscuro) de su producción.....		121
Figura 57. Gráficos de puntos biparamétricos que muestran la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio de tres lotes distintos de células troncales mesenquimales de médula ósea expandidas y fucosiladas según protocolo normalizado a las 0 horas (fila de arriba), 24 horas (fila de central) y 48 horas (fila de abajo). Las células vivas se sitúan en cada <i>plot</i> en el cuadrante inferior izquierdo coincidiendo con la negatividad simultánea a ambos marcadores, Anexina V y Ioduro de Propidio.....		122
Figura 58. Histograma de expresión de HECA452 en las muestras de tres lotes distintos de CSM-MOFUC sometidos al estudio de estabilidad a las 0, 24 y 48 horas.....		123

Tabla 1. Proteínas expresadas por las células troncales mesenquimales.....	12
Tabla 2. Resumen de Controles de calidad requeridos para la producción de las CSM.	42
Tabla 3. Anticuerpos usados para la detección por citometría de flujo de HCELL.	52
Tabla 4. Anticuerpos usados para verificación de la exofucosilación por Western-Blot.	54
Tabla 5. Especificaciones del medicamento Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas (CSM-MOFUC).....	62
Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la validación de la fucosilación por citometría de flujo.	78
Tabla 7. Resultados Media Fill del cultivo y expansión de CSM-MO.	103
Tabla 8. Requisitos y criterios de aceptación del material biológico de partida	106
Tabla 9. Número de células, pase y número de duplicaciones de las células despegadas para fucosilación.....	108
Tabla 10. Resultado de los controles de esterilidad de los lotes de validación.	110
Tabla 11. Porcentajes de viabilidad de los cuatro lotes de validación con Azul Tripan y Anexina V	116
Tabla 12. Niveles de expresión de C-myc de los cuatro lotes de validación.....	118

INTRODUCCIÓN

1. CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES.

1.1. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TRONCALES.

Las células madre o troncales son células precursoras de los tejidos con capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación a células de múltiples linajes (1–3).

Estas células son capaces de renovarse a sí mismas por medio de división celular incluso después de períodos largos de inactividad. Esta capacidad clonogénica se mantiene por largos períodos de tiempo dependiendo del tipo específico de célula troncal. Otra característica fundamental es que bajo determinadas condiciones fisiológicas o experimentales pueden diferenciarse hacia células de tejidos u órganos con funciones específicas. Cuando una célula troncal se divide, lo hace de forma asimétrica, es decir, da lugar a una célula troncal genéticamente igual a la inicial (clonogenicidad) y a otra célula comprometida hacia un linaje determinado. Éste último proceso se conoce como “diferenciación”. Estas características les confieren la capacidad de mantener o reparar los diferentes tejidos y órganos en los que se encuentran (4). Dependiendo de su procedencia las células troncales se dividen en células troncales embrionarias (CTE) o células troncales somáticas (CTS).

Las células troncales embrionarias son células pluripotentes procedentes de embriones en fases tempranas del desarrollo (Figura 1).

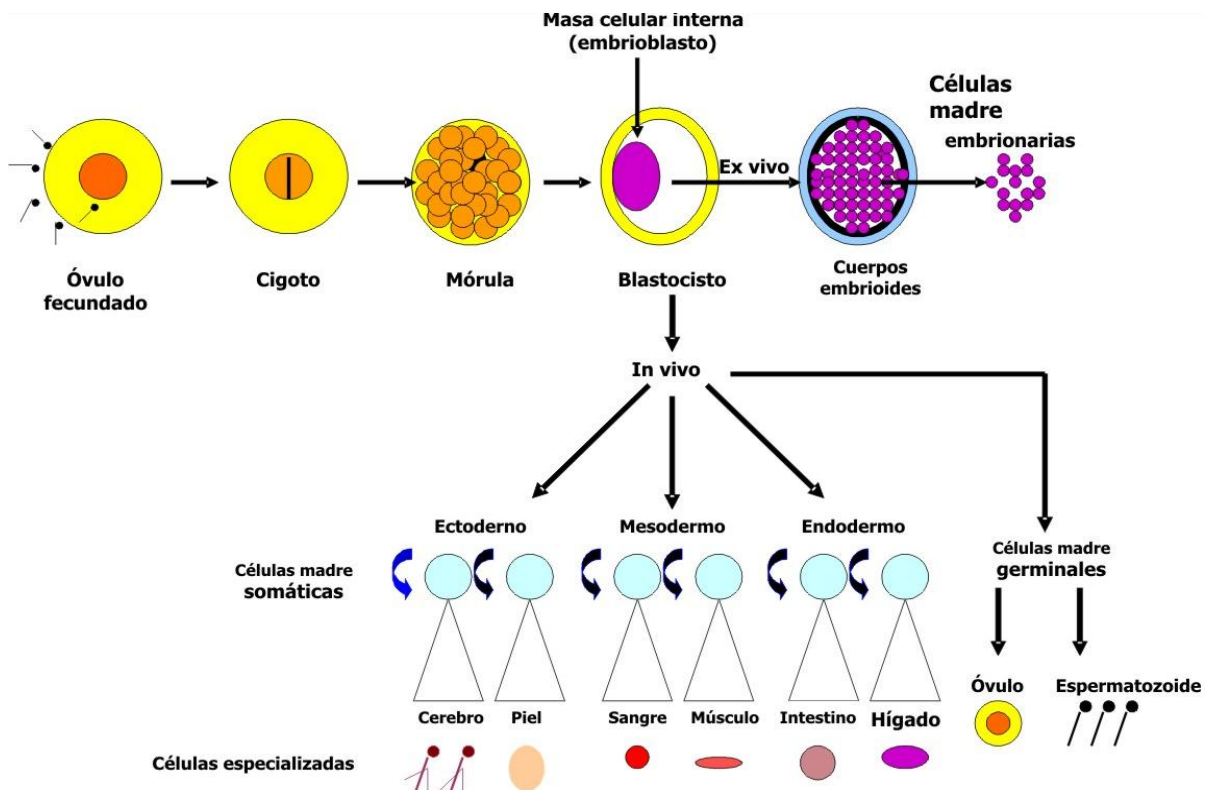


Figura 1. Origen de las células madre. Imagen tomada de Hernández et al 2004.

Las células troncales somáticas, también llamadas células troncales del adulto, son células presentes en diferentes tejidos del organismo y multipotentes (Figura 2). El término multipotencia indica la capacidad de estas células para dar lugar sólo a unos determinados tipos de células de diferentes tejidos, generalmente limitados a los derivados de la capa embrionaria de la que proceden o los tipos celulares presentes en el órgano en que se encuentran. En cambio, el término pluripotencia hace referencia a la capacidad para dar lugar a todos los diferentes tipos celulares del organismo.

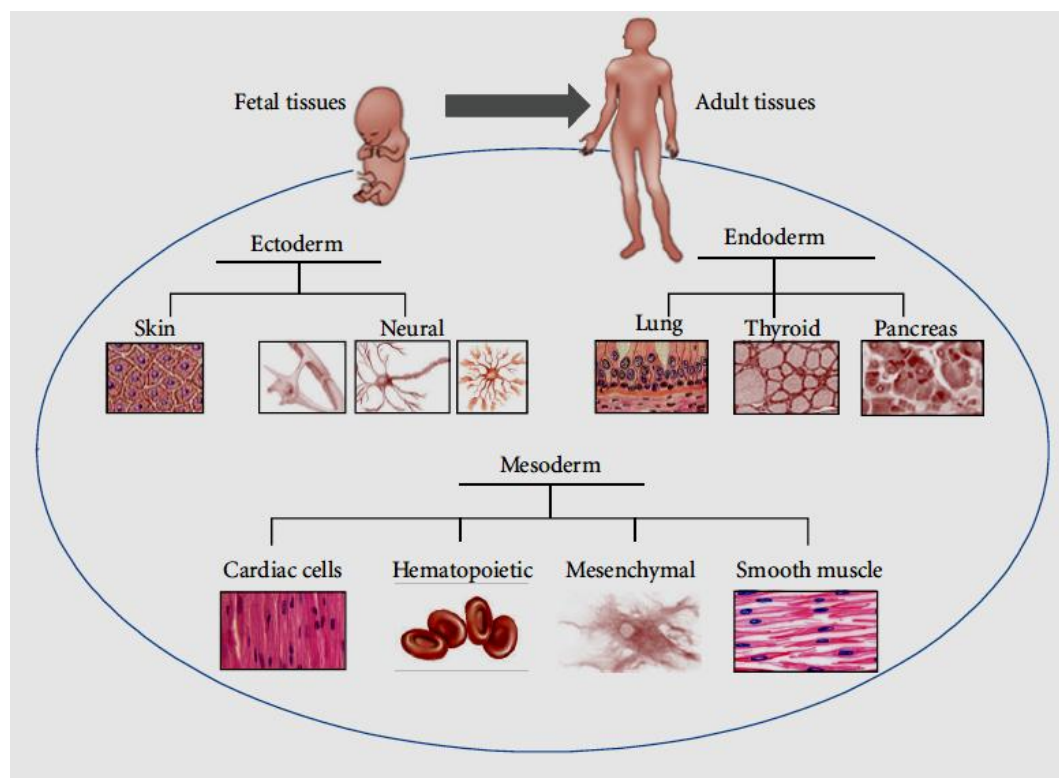


Figura 2. Células troncales somáticas. Imagen tomada de Sabine Wislet-Gendebien et al 2012.

Se han descrito en diferentes estudios varios tipos de CTS aunque las más estudiadas han sido las células troncales hematopoyéticas, que se encuentran en la médula ósea y que dan lugar a todos los tipos celulares presentes en la sangre. La biología y mecanismo de acción de estas células ha sido ampliamente descrito, por lo que en las últimas décadas los investigadores han comenzado a centrar sus estudios sobre otros tipos de CTS, como por ejemplo las células troncales mesenquimales, intestinales, y neurales entre otras (5).

De los tipos celulares previamente descritos, las células troncales mesenquimales (CSM) o en inglés *mesenchymal stem cells* (MSC) son células con capacidad de autorrenovación que pueden encontrarse en casi todos los órganos y tejidos postnatales (6).

Estas células son las que han generado un mayor interés entre los investigadores y clínicos ya que pueden ser fácilmente aisladas mediante aspirado de médula ósea o tejido adiposo, entre otros, y se pueden expandir a escala clínica en condiciones in vitro. Además, las CSM ofrecen

otras ventajas como la posibilidad de almacenamiento a largo plazo sin pérdida importante de potencia y su baja inmunogenicidad en el trasplante alogénico (7).

A pesar de su ubicuidad, las CSM se encuentran predominantemente en el estroma de la médula ósea. El gran interés que existe por estas células proviene de su capacidad para diferenciarse hacia tejidos como grasa y tejido conectivo, tejidos del sistema musculoesquelético como hueso (8), cartílago (9) y tendón (10), y recientemente se ha demostrado su gran plasticidad al observar capacidad para diferenciarse hacia células de músculo liso (11,12), cardiomiocitos (13,14) e incluso tejido neural (15). La plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse a tipos celulares diferentes de su tejido de origen, o incluso de una capa embrionaria diferente. Además estas células presentan efectos locales regulando el microambiente que las rodea mediante efectos paracrinos e inmunomoduladores (15).

1.2. ORIGEN DE LAS CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CSM).

El primero en plantear la hipótesis de la presencia de células con capacidad regenerativa fue Cohnheim (16), que a finales del siglo XIX planteaba la hipótesis de que los fibroblastos derivados de la médula ósea (MO) estaban involucrados en la curación de heridas a nivel de todo el organismo. Posteriormente, Maximow (17) describió una relación fundamental entre el desarrollo del tejido mesodérmico y la sangre durante la embriogénesis. Entre los años 60 y 70, Friedenstein y sus colaboradores hallaron en el estroma de la MO de ratones y cobayas un tipo de células adherentes al plástico con alta capacidad replicativa *in vitro* y formadoras de colonias fibroblásticas (18,19). Friedenstein describió que tras la siembra de una muestra de MO, al eliminar las células en suspensión quedaba una población heterogénea de células adheridas al plástico. Dichas células tras ser cultivadas se replicaban generando colonias de células con un aspecto similar a los fibroblastos del tejido conectivo. A este tipo de células las denominaron “Unidades formadoras de colonias de fibroblastos” (CFU-F, del inglés “colony-forming units fibroblasts”). Posteriormente encontraron que estas colonias de fibroblastos, al ser trasplantadas *in vivo* en cobayas podían generar osteoblastos, por lo que en dicho estudio postulaban la posibilidad de que estas células fueran las responsables de generar el soporte estromal necesario para albergar el tejido hematopoyético (20,21). Al final de la década de los 80 y principios de los 90, se dirimió que la población heterogénea de células troncales mesenquimales de la MO estaba vinculada al desarrollo de diversos tejidos mesenquimales. Así mismo, se identificaron los primeros antígenos de superficie expresados por la CSM, que fueron el CD73 y el CD 105 (22–25,25,26). Debido a su vinculación con la formación de tejidos mesenquimales durante el desarrollo embrionario, estas células se denominaron “Células Madre Mesenquimales” (27), denominación que fue reforzada por Pittenger et al., al demostrar la capacidad de estas células para diferenciarse *in vitro* en células de tejidos de origen mesenquimal como el hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo, y estroma medular (28).

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CSM.

1.3.1. Morfología.

Las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado central, que contiene de dos a tres nucléolos (29–31). Aunque algunos autores han reportado que las capas de células troncales mesenquimales en cultivo contienen células con una morfología homogénea (28), existe una mayor evidencia de que estas capas son heterogéneas y contienen células, morfológica y funcionalmente distintas.

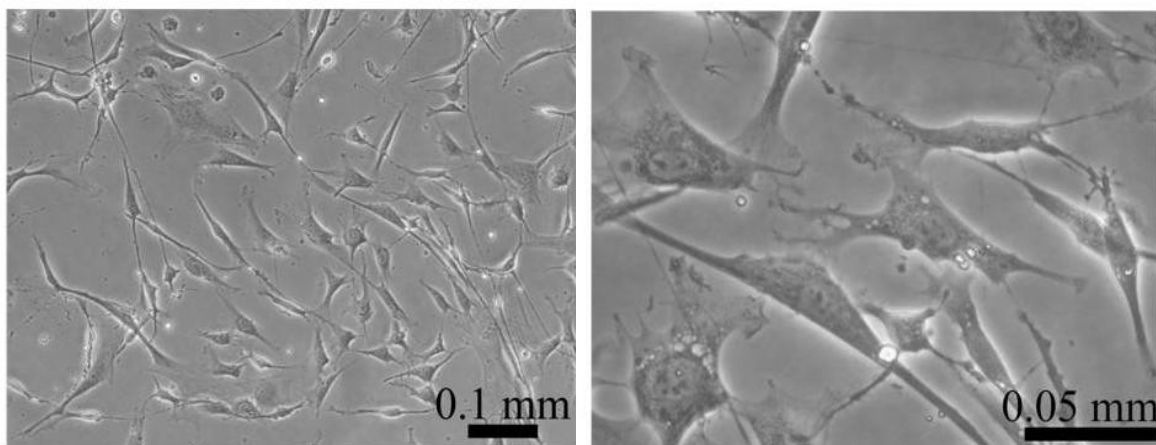


Figura 3. Imagen de microscopia de contraste de fases de CSM de sangre periférica. Imagen tomada de Lyahyai et al 2012.

Desde los primeros estudios de Owen, se observó que las colonias de células troncales mesenquimales contenían células morfológicamente diferentes (32,33). Estos autores describieron células fibroblastoides, fusiformes, las cuales formaban colonias compactas y colonias abiertas y, otro tipo de células, a las cuales denominaron de tipo epitelial, que eran células más pequeñas, con núcleos más intensamente teñidos y morfológicamente semejantes a células epiteliales.

Un año más tarde, el trabajo publicado por Mets y Verdonk enfatizó la presencia de dos tipos celulares: el tipo I, formado por células pequeñas y fusiformes, y el tipo II, constituido por células más grandes, aplanadas y de proliferación más lenta (34).

Dando un paso más allá, los estudios de citometría de flujo realizados por Prockop *et al.* permitieron describir tres tipos de células en los cultivos de CSM (35–37). Estos investigadores separaron tres subpoblaciones, una de células pequeñas, fusiformes y agranulares, a la cual denominaron RS–1; otra de células pequeñas y granulares, denominada RS–2; y la última conformada por células más grandes y granulares a las cuales denominaron como células mesenquimales maduras o mCSM. Estos autores postularon que las células RS–1 corresponden a CSM proge-

nitoras, con un índice de proliferación elevado, que dan origen a las células RS-2 y estas últimas a las mCSM.

Más recientemente Flores describe la presencia de dos tipos de morfología en cultivos de células troncales mesenquimales. La mayoría de las células son espigadas con morfología fibroblastoide, y una proporción menor de células en el cultivo presentan un mayor tamaño y morfología romboide (38).

1.3.2. Fenotipo.

Tras el descubrimiento y caracterización de las CSM, los científicos deseaban un método para aislar de forma prospectiva poblaciones de células progenitoras basados la selección de marcadores expresados en la superficie celular. Los primeros marcadores incuestionablemente identificados en las CSM fueron CD73 (SH-3/4) y CD105 (endogлина o SH-2), seguido después por CD90 y CD44 (25,39). Desde entonces se ha descubierto que la población cuádruple positiva de CD90/CD105/CD73/CD44 es común a los fibroblastos y las células del estroma, y sólo sirve para discriminar estos tipos de células de las de origen hematopoyético (40–43). En 2006, la ISCT estableció un conjunto criterios mínimos para la definición de las CSM como: (1) células adherentes de plástico; (2) capacidad de diferenciación tri-linaje (hueso, cartílago y grasa); (3) fenotípicamente positivas para CD105, CD73 y CD90; y (4) negativas para CD45, CD34, CD11b, CD14, CD79a y HLA-DR.

Estos criterios se basan en la caracterización de las células cultivadas *in vitro* y no se aplican al fenotipo nativo *in vivo*. Por ejemplo, el CD34 se considera un marcador para células hematopoyéticas y progenitores endoteliales directamente de aspirados de médula ósea, pero no de CSM (44,45). Sin embargo, otros autores han clasificado las CSM obtenidas de lipoaspirado como CD34+ antes de su cultivo *in vitro* (46–48). Mitchell y colaboradores (49) demostraron que el 60% de las células del estroma vascular fresco procedente de lipoaspirados que producen CFU-F son CD34+ y que la expresión CD34 disminuye dramáticamente en cada pase de cultivo. Zimmerlin y colaboradores (50) propusieron que dos tipos distintos de células en el estroma perivascular del tejido adiposo, los pericitos (CD146+ / CD34- / CD31-) y las células de la capa supraadventicia estromal (CD146- / CD34+ / CD31-) daban lugar a CFU-F. Simmons identificó el anticuerpo Stro-1 como una marcador para enriquecer CFU-F más de 100 veces en MO fresca y para identificar progenitores estromales y osteogénicos (51–53). Se ha detectado Stro-1 en células CFU-F *in vitro* derivadas del estroma vascular y se ha localizado *in vivo* en el endotelio de algunos vasos sanguíneos (54). Frente a estos resultados y por el origen de pericitos y CSM, el fenotipo *in vivo* de las CSM sería Stro-1+/CD90+/ CD105+/CD73+/CD44+/ CD45-/11b-/ CD14- con poca o ninguna expresión de CD34.

Hallazgos similares sobre la variedad fenotípica fueron encontrados en cultivos celulares procedentes de muestras de tejido dérmico (55). La expresión diferencial de marcadores CD en las CSM de distintos tejidos estaría relacionada con las diferencias de potencial en el microambiente perivascular (56). No obstante, los estudios más recientes corroboran la presencia de un

conjunto común de marcadores coexpresados en las células estromales del tejido adiposo, piel y médula ósea como son CD 90, 73, 29, 44, 105 y 13, y ausencia de los marcadores CD34, CD45, CD14 y HLA-DR (55).

1.3.3.Potencial de Diferenciación.

Además de caracterizarse por los marcadores de superficie, las CSM deben adherirse al plástico y diferenciarse a osteoblastos, adipocitos, y condroblastos bajo condiciones *in vitro* (57). La diferenciación está regulada por acontecimientos genéticos en los que están implicados factores de transcripción. Una vía particular de diferenciación fenotípica se puede controlar por algunos genes reguladores que inducen la diferenciación al progenitor celular de un linaje específico. Además de la inducción con factores de crecimiento y productos químicos, se puede construir un microambiente que aporte a las CSM condiciones adecuadas para su proliferación y diferenciación (58). Aunque las CSM pueden diferenciarse en una serie de tejidos *in vitro*, la población de células resultante no imita enteramente los tejidos diana en sus propiedades bioquímicas y biomecánicas (59).

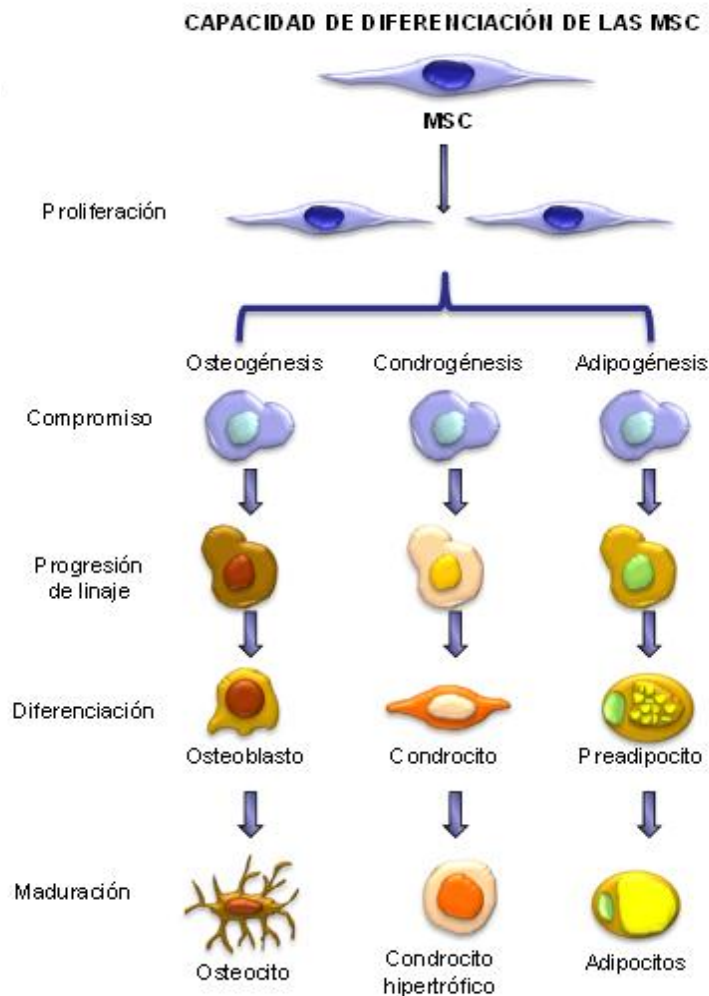


Figura 4. Diferenciación mesodérmica de las CSM. Modificado de Montesinos JJ y Castro ME 2011.

La **Diferenciación mesodérmica** (osteogénica, adipogénica y condrogénica) es fácilmente alcanzable para las CSM (o MSC en inglés) porque poseen el mismo origen embrionario.

La diferenciación osteogénica implica el progreso de una serie de etapas, en las cuales se obtienen estadios intermedios de diferenciación osteoblástica que culminan con la formación de osteoblastos maduros y funcionales. Es posible reconstituir este modelo de osteodiferenciación bajo condiciones *in vitro*, mediante el cultivo de CSM en presencia de factores osteoinductores. Como factores osteoinductores se utilizan Dexametasona, β - Glicerofosfato y Ácido Ascórbico (AA) (59–61). La Dexametasona, estimula la proliferación de las CSM y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico. El β -Glicerofosfato actúa como sustrato de fosfato orgánico, necesario para la formación de hidroxapatita (62). En presencia de estos suplementos, las CSM adquieren cambios morfológicos y aumentan la actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina (FA), la cual juega un papel fundamental en la mineralización de la matriz extracelular. La FA hidroliza los ésteres de fosfato, liberando fósforo inorgánico, que produce depósitos de cristales de hidroxapatita, mineral indispensable para el inicio de la etapa de diferenciación (63). Previamente a la osteodiferenciación, las CSM comienzan a multiplicarse, aumentando la expresión de genes asociados a la proliferación celular, como el factor de transcripción “Core-binding factor α -1” (CBFA1) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (64). Posterior a la proliferación celular, comienza el proceso de diferenciación caracterizado por la activación de la FA, que cataliza la eliminación de grupos fosfatos permitiendo la presencia de un pH alcalino y propiciando el crecimiento y el desarrollo óseo. Esta enzima es indispensable para la formación del hueso y el aumento de su actividad indica el inicio de la etapa de diferenciación (63). La última etapa del proceso osteogénico se encuentra caracterizada por la expresión de proteínas involucradas en la organización de la matriz extracelular, como el colágeno tipo 1. Además durante esta etapa aumenta la expresión de proteínas que colaboran en la formación del mineral óseo, entre las que se encuentran osteopontina, sialoproteína ósea y osteocalcina (60,65,66). La osteocalcina es una de las proteínas más abundantes de la matriz extracelular, su expresión está altamente restringida al tejido óseo, específicamente a las regiones destinadas a la mineralización. Esta proteína es producida únicamente por el osteoblasto durante el proceso osteogénico, por lo tanto, es un marcador de diferenciación osteogénica ya que adquiere sus máximos niveles de expresión durante el período de mineralización (67).

Por otra parte, la inducción del proceso de diferenciación condrogénica *in vitro* se ha visto favorecida con la adición de factores como el Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1), Dexametasona, solución ITS (Insulina, Transferrina y Ácido selénico), Piruvato y Ascorbato 2-fosfato (68). Para este tipo de diferenciación se utiliza una alta densidad celular mediante cultivo en pellet o micromasa (69). Este tipo de cultivo permite la formación de uniones intercelulares que conducen a la agregación celular y facilitan el proceso de diferenciación (70). El TGF- β 1 induce agregación celular y estimula la diferenciación, promoviendo el depósito de proteoglicanos (71) estimulando la isoforma activa del receptor de glucocorticoides GR- α . Además, el TGF- β 1 actúa sinérgicamente con la Dexametasona, regulando en forma positiva la expresión de genes

de matriz extracelular (68).

En el caso de la diferenciación adipogénica *in vitro*, se utilizan factores inductores como Dexametasona, Insulina, Indometacina y 3- Isobutilmetilxantina (28). La Dexametasona induce la expresión de la proteína $\alpha 2$, proteína específica del tejido adiposo (72). Sin embargo ésta debe actuar sinérgicamente con otras moléculas como la Fosfodiesterasa, Isobutilmetilxantina e Insulina para inducir la expresión de otros genes específicos del linaje adipogénico (72,73). Por su parte, la Indometacina estimula la expresión de PPAR- γ , cuya función es regular el proceso de diferenciación adipogénica (74).

Diferenciación ectodérmica.

La diferenciación neuronal *in vitro* de CSM puede ser inducida por DMSO, hidroxianisol butilado (BHA), β -mercaptoetanol, KCL, forskolina, e hidrocortisona (58). Las vías de señalización Notch y la mediada por proteína quinasa A (PKA) se encuentran implicadas en la diferenciación neuronal de las CSM (75). En presencia de otro estimulante, la baja expresión de la caveolina-1 también promueve la diferenciación neuronal de CSM a través de la vía de señalización Notch (76).

Diferenciación endodérmica

En la diferenciación hepática, el factor de crecimiento de los hepatocitos y la oncostatina M se utilizaron para obtener células cuboides que expresaban marcadores característicos (α -fetoproteína, glucosa 6-fosfatasa, tirosina aminotransferasa, y CK-18) y producían albúmina *in vitro* (77). En el caso de la diferenciación pancreática estudios recientes han desarrollado métodos para conseguir células β de los islotes a partir de células madre adultas. Las células resultantes mostraron una morfología específica, alto contenido en ARNm de insulina-1, y la síntesis de insulina y nestina (78,79).

1.4. TEJIDOS FUENTE DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.

Las células estromales de médula ósea fueron las primeras en describirse y las más utilizadas (19,28). Sin embargo, el requisito de métodos invasivos para su obtención apoyó la búsqueda de fuentes alternativas más accesibles, como el tejido adiposo (80–82), piel (83), ligamento periodontal (84), sangre periférica (85,86) o la pulpa dental (87–89). También se ha descrito la presencia de CSM en pulmón (90), músculo (91), sistema nervioso central (92–94) y líquido sinovial (95).

Además de estos tejidos adultos, se pueden obtener CSM en el alumbramiento asociadas a tejidos fetales (96,97), incluyendo la placenta (98–102), membrana amniótica (103,104), amnios (105), vellosidades coriónicas de la placenta (106) y el cordón umbilical (107) con la ventaja de su disponibilidad evitando la necesidad de procedimientos invasivos y la eliminación de otras preocupaciones éticas. Se han obtenido diferentes tipos de CSM a partir del cordón umbili-

cal dependiendo de si se aíslan de la totalidad cordón umbilical (108,109), de la gelatina Wharton (110) de la sangre del cordón umbilical (98,111,112), o de las zonas peri vasculares (113). También se pueden encontrar en la sangre menstrual (114–117), y la leche materna (118). En particular, las células humanas del cordón umbilical peri vasculares, pueden ser candidatas ventajosas para la terapia celular debido a su menor variabilidad entre los donantes, corto tiempo de duplicación, y su disponibilidad (119).

A pesar de su diverso origen, todas estas células muestran escasas diferencias en cuanto a morfología, capacidad de adherencia a superficies plásticas, senescencia celular y/o capacidad de diferenciación. (107,120–122). Este hecho unido a la inexistencia de un marcador específico que identifique cada población celular, hace que se las considere también células madre mesenquimales y que la utilización de unas u otras en aplicaciones terapéuticas dependa de la disponibilidad o accesibilidad a los tejidos donantes y de la facilidad de expansión *in vitro*. Sin embargo, se han descrito diferencias en su papel funcional. Por ejemplo, las células mesenquimales derivadas de médula ósea y de la gelatina Wharton tienen diferente capacidad de proliferación (119) y secretoma y perfiles proteómicos distintos (123,124).

1.5. PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.

1.5.1. Propiedades tróficas.

La propiedad trófica principal de las CSM es la secreción de factores de crecimiento y otras quimiocinas para inducir la proliferación celular y la angiogénesis. Las CSM expresan proteínas mitogénicas tales como el factor de crecimiento transformante alfa- (TGF- α), TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) para aumentar el número de fibroblastos y la división de la célula epitelial (125–128). Por otro lado liberan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), IGF-1, EGF y angiopoyetina-1 para reclutar células de linaje endotelial y promover la neoangiogénesis (129). Se ha planteado la hipótesis de que el genotipo de cada individuo tiene un papel fundamental en la expresión y secreción de estas citocinas, dando crédito a la filosofía de la medicina personalizada utilizando dosis de CSM combinadas con proteínas o factores de crecimiento autólogos (por ejemplo, plasma rico en plaquetas) (130).

Los efectos tróficos de las CSM se extienden más allá de la proliferación, a la cicatrización. Esto se debe presumiblemente a que las células locales secretan factores paracrinos como el factor de crecimiento de queratinocitos, el factor derivado de la célula estromal-1 (SDF-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa y beta (131,132).

1.5.2. Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de CSM.

Tipo de marcador	Nombre	Referencias
Moléculas de la matriz extracelular	Colágeno I, II, III, IV, V y VI	Chichester, 1993 Minguell, 2001 Flores-Figueroa 2006 Amable 2014
	Fibronectina	
	Laminina	
	Acido hialuronico	
	Elastina	
	Heparan sulfato	
	Decorina	
	Agrecano	
	Tenascina	
	Vimentina	
Moléculas de adhesión y proteínas de membrana	ICAM-1, 2 y 3	Pittenger, 1999 Conget,1999 Majumdar, 2003 Deans,2000 Flores-Figueroa 2006 Amable 2014
	VCAM-1	
	LFA-3	
	ALCAM-1	
	CD44	
	Integrina $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$ y $\alpha 6$	
	Integrina αV	
	Integrina $\beta 1, \beta 3$ y $\beta 4$	
	MCAM/MUC18	
	NCAM	
	TETRASPAN	
Citoquinas y factores de crecimiento	IL-6,7,8,11,12,14 y 15	Haynesworth,1996 Majundar, 1998 Deans, 2000 Holgate 2000 Caplan 2001 Flores-Figueroa 2006 Doorn 2011 Murphy 2012 Yang 2013 Nakamura 2013 Amable 2014
	Flt-3	
	IL-1RA	
	MCP-1	
	Eoxantina	
	MIP-1 α y 1 β	
	MMP-1 y 3	
	LIF	
	M-CSF	
	G-CSF	
	SDF-1	
	MCP-1	
	PIGF	
	VEGF	
	Endostatina	
	Trombospondina 1	
	Angiopoyetina 1	
	Angiogenina	
	PLGF	
	TGF $\alpha, \beta 1$ y $\beta 2$	
	HGF	
EGF		
FGF-2		
IGF-1		
PDGF-AA		
KFG		

Tabla 1. Proteínas expresadas por las células troncales mesenquimales.

En muchos tipos de traumatismo musculoesquelético, las condiciones inflamatorias en el sitio de la lesión impiden los procesos de reparación natural por progenitores locales y células maduras. Las CSM modulan a través de mecanismos paracrinos este ambiente inflamatorio. En respuesta a moléculas tales como interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-12, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interferón-gamma (INF- γ), las CSM secretan una variedad de factores de crecimiento y proteínas anti-inflamatorias con complejos mecanismos de retroalimentación que implican a muchos tipos de células inmunes (133–138). Las citoquinas clave en la inmunomodulación incluyen la prostaglandina 2, TGF- β 1, HGF, SDF-1, óxido nítrico, indoleamina 2,3-dioxigenasa, IL-4, IL-6, IL-10, el antagonista del receptor de la interleuquina-1 y el receptor soluble del factor de necrosis tumoral. Las CSM impiden la proliferación y función de muchas células inmunes inflamatorias, incluyendo las células T, células NK, células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas (134,139,140). Una característica de los ambientes crónicamente inflamados es un desequilibrio persistente en los tipos de células T auxiliares y los macrófagos (141–143). Las CSM promueven indirectamente la transición de células TH1 a células TH2 mediante la reducción de INF- γ y el aumento de IL-4 y IL-10 (7,133). Se ha demostrado que la restauración del equilibrio TH1/TH2 mejora la regeneración de tejidos en el cartílago, músculo y otros tejidos lesionados, alivia los síntomas de enfermedades autoinmunes y tiene un efecto antidiabético (144–148). Del mismo modo, la reducción de INF- γ y la secreción de IL-4 promueve un cambio en los macrófagos de tipo M1 (pro-inflamatorios, anti-angiogénicos y de inhibición del crecimiento) a tipo M2 (pro-remodelación, antiinflamatorio y de cicatrización de los tejidos), un efecto requerido para la regeneración esquelética, muscular y neural (57,141,146,149,150).

Las CSM indiferenciadas expresan niveles bajos a medios de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I y bajos niveles de HLA de Clase II para evitar el reconocimiento por el sistema inmune (57,151) en terapias alogénicas. Sin embargo, el INF- γ puede inducir niveles detectables de antígeno de clase I y la expresión del antígeno de clase II (152,153). Se han reportado varios casos de rechazo de CSM alogénicas y respuestas inmunes crónicas en estudios animales y ensayos clínicos en humanos (154–156).

1.5.3. Propiedades anti-apoptóticas.

Otra propiedad importante de CSM es la capacidad para rescatar células apoptóticas inducidas por exposiciones traumáticas a la hipoxia, productos químicos, daño mecánico y la radiación. Por ejemplo, las CSM han demostrado revertir la apoptosis en cardiomioblastos después de la isquemia, así como las neuronas dañadas y los fibroblastos de pulmón (123,157,158). Los mecanismos anti-apoptóticos de las CSM no se entienden completamente, pero se han identificado varias proteínas clave. La secreción de IGF-1 e IL-6 aumenta la expresión de Akt (proteína quinasa B) y NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (159,160). La elevada expresión de Akt aumenta la secreción SFRP2, un miembro de la vía de señalización Wnt y un mediador clave de la anti-apoptosis en células de tipo fibroblástico mediante el bloqueo específico de Wnt3a (161–164). Otros investigadores (165) han aislado la

stanniocalcina-1 designándola como un molécula esencial para la neutralización de apoptosis en los fibroblastos dañados por la radiación ultravioleta y la acidez. No está claro si las proteínas SFRP2 y stanniocalcina-1 están relacionadas o actúan de forma independiente en sus mecanismos antiapoptóticos. Se sabe que los efectos anti-apoptóticos provocan el aumento de expresión de Bcl-2, Bcl-xL y de la proteína de choque térmico (166,167). En los fenómenos de apoptosis relacionados con la hipoxia, se sabe que las CSM aumentan significativamente la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y que VEGF, HGF y TGF- β 1 tienen un papel esencial en la reversión de la apoptosis de la célula endotelial (168).

1.5.4. Propiedades antimicrobianas.

La defensa inmune nativa contra las infecciones microbianas incluye moléculas efectoras tales como polipéptidos antimicrobianos, catelicidinas, lisozimas, lactoferrina y defensinas (169–171). Un péptido particular de la familia de catelicidinas en los seres humanos es hCAP-18/LL-37. LL-37 es comúnmente secretada por las células epiteliales y macrófagos fagocíticos para luchar contra infecciones por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero también se expresa por las CSM (172–174). La producción de LL-37 es un control sistémico contra sepsis y las bacterias, de hecho las CSM secretan dicho péptido en respuesta a *Escherichia coli* y otros microbios (175,176). Este descubrimiento sugiere que las CSM son un agente terapéutico potencial para las infecciones agudas y sistémicas. Bonfield y colaboradores (177) demostraron en un modelo murino de fibrosis quística con infección pulmonar crónica que la administración sistémica de CSM reducía significativamente la pérdida de peso. Este estudio no sólo demuestra un efecto directo sobre los microbios, sino la influencia en el reclutamiento de células inmunes. También se observó en humanos que las CSM actúan frente a las bacterias y parásitos protozoarios aumentando la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa, enzima que regula la activación de las células T (161,178–180).

1.6. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA.

Las CSM de médula ósea (CSM-MO) generalmente se aíslan de aspirados de la cresta iliaca posterosuperior, pero alternativamente también se pueden obtener de los compartimentos medulares de tibia, fémur o esternón. Estos aspirados son posteriormente cultivados en placas con medio suplementado con factores de crecimiento (181). La población resultante de células con adherencia al plástico se considera cultivo primario de CSM-MO *ex vivo* y suele constituir entre el 0,001 y el 0,01% del total de las células mononucleadas de la médula. Estas CSM-MO recién aisladas se mantienen en cultivo durante varios días, en los cuales las células hematopoyéticas no adherentes van siendo eliminadas con los sucesivos cambios de medio. Vistas a través del microscopio, constituyen una población más o menos homogénea de células con una morfología fusiforme similar a la que presentan los fibroblastos.

Las CSM-MO pueden ser subcultivadas, manteniendo normales su cariotipo y su actividad telomerasa. Sin embargo, si se cultivan durante periodos extensos se pueden observar signos de

senescencia, lo cual puede afectar a la multipotencialidad de estas células y disminuir su capacidad de diferenciación (182). Este fenómeno se conoce como senescencia replicativa, el cual suele ser común en cultivos de células diploides (183) y puede ser causado por varios factores, incluyendo el acortamiento de los telómeros durante subcultivos continuados *in vitro* o la ausencia de actividad telomerasa. Además, existe cierta variabilidad en su capacidad de expansión, ya que mientras algunas preparaciones de CSM-MO pueden ser expandidas hasta 35-40 veces, otras cesan su crecimiento después de 5-10 pases (184). Este hecho se puede deber a varios motivos, por ejemplo, el procedimiento usado para aislar y cultivar las células, la baja existencia de CSM-MO frente a las células hematopoyéticas en el aspirado de médula ósea utilizado o incluso al propio donante (185).

Como se ha dicho anteriormente, el aislamiento de las CSM-MO se basa en su adherencia a las superficies plásticas utilizadas para su cultivo. Debido a esto, el principal inconveniente derivado del propio método de aislamiento, es la heterogeneidad celular del cultivo inicial, ya que es difícil evitar contaminaciones con otros tipos celulares presentes en el aspirado y que también se adhieran al plástico. Esto supone una limitación para el posible uso clínico de estas poblaciones, ya que los resultados pueden tener una baja reproducibilidad. Por este motivo, hay investigadores que han intentado desarrollar diferentes sistemas para obtener poblaciones celulares homogéneas, muchos basados en el desarrollo de una serie de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie de las CSM-MO. En 1991, Simmons y Torok-Storb (51), desarrollaron un anticuerpo monoclonal denominado Stro-1 capaz de reaccionar con células progenitoras no hematopoyéticas del estroma de la médula ósea para aislar poblaciones puras de células con características de CSM-MO. En 1992, Haynesworth y colaboradores(25), utilizaron el anticuerpo SH-2 frente CSM-MO humanas, el cual reacciona con un epitopo presente en el receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) conocido como CD105 o endoglina, que al igual que los anticuerpos SH-3 y SH-4 los cuales reconocen distintos epitopos de CD73, también conocido como 5'-nucleotidasa (186), no reaccionan con células hematopoyéticas o con osteoblastos. En 1997, Bruder y colaboradores, utilizaron el anticuerpo SB-10 para caracterizar poblaciones de CSM-MO indiferenciadas. El antígeno específico de SB-10 se identificó como CD166, el cual juega un papel importante en la ruta de diferenciación osteogénica (187).

Desafortunadamente, los antígenos identificados mediante procedimientos similares a los anteriormente descritos, se expresan en variedad de tipos celulares y no son únicamente específicos de CSM-MO. Este hecho dificulta su identificación y las hace poco diferenciables *in vivo* de otras poblaciones celulares, ya que por ejemplo comparten marcadores con linfocitos, células endoteliales, epiteliales y musculares.

2. MIGRACION Y “HOMING”.

El éxito de la aplicación clínica de terapias basadas en células depende de la llegada de estas células al sitio (s) del tejido requerido con la máxima eficacia, un proceso denominado

"Homing". Para minimizar la morbilidad, los principios clínicos dictan que las células deben administrarse por vía intravascular. Luego la eficacia terapéutica de CSM depende en gran medida de su capacidad para llegar al órgano / tejido enfermo y poder ejercer sus efectos. Para que esto sea posible se requiere la **migración** de las CSM al órgano/tejido enfermo atravesando el endotelio vascular. La comprensión profunda de los mecanismos moleculares que conducen al tráfico de células desde el sistema vascular es esencial para el diseño y la aplicación de estrategias que permitan terapias celulares como la medicina regenerativa basada en células madre.

La mayoría de aportaciones sobre los mecanismos de migración y homing se basan en estudios que evaluaron la migración de leucocitos a los tejidos inflamados (188) (189), de células hematopoyéticas a la médula ósea (190) y de la metástasis del cáncer (191). Los procesos migración y homing requieren que las células pueden adherirse y migrar a través de las células endoteliales para entrar en el tejido diana.

2.1. MIGRACIÓN TRANSENDOTELIAL.

El reclutamiento de subpoblaciones de células del flujo sanguíneo hacia los tejidos es crítico para gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la inmunidad, la reparación de tejidos, y la metástasis del cáncer. La extravasación tiene lugar dentro de las vénulas postcapilares bajo condiciones de estrés de cizalla ya que la velocidad de flujo sanguíneo suele ser de 1-4 dinas /cm² (192). Gran variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* han establecido que la migración de células desde los vasos sanguíneos a compartimientos extravasculares se rige por una cascada de interacciones moleculares (193,194). El 'Paso 1' en este proceso implica la captura o frenado de las células de la corriente sanguínea en el endotelio del tejido diana. Este proceso, mediado principalmente por las selectinas y sus ligandos, da lugar al frenado inicial y posterior rodamiento de las células en contacto directo con la superficie endotelial, a velocidades muy por debajo de la corriente de fluido. Este rodamiento permite un estrecho contacto de la célula con el endotelio a lo largo de distancias que oscilan entre pocos micrómetros a varios milímetros. De esta manera las células pueden exponerse a señales químicas (principalmente quimiocinas, citoquinas y otros agentes inflamatorios) presentes en el medio local (Paso 2), dando lugar a la activación de la integrina que se une a su receptor endotelial conduciendo a una adhesión firme (Paso 3), seguido por la transmigración endotelial (Paso 4) (Fig. 5).

El paso 2 es crítico para que tenga lugar toda la cascada, siendo los principales mediadores de esta firme adhesión las integrinas, VLA-4 y LFA-1. La transición de los pasos 1 a 3 está orquestada por la actividad combinada de diversas quimiocinas. Las quimiocinas comprenden una superfamilia de pequeñas proteínas que funcionan como agentes quimiotácticos (194). Algunas quimiocinas tienen una distribución específica de tejido, mientras que la expresión de otras es dependiente de la inflamación. Luego la extravasación es impulsada por gradientes de quimiocinas presentes en el compartimento subendotelial. (195) Sin embargo, sólo aquellas células que pueden tener un anclaje inicial y posteriormente un rodamiento por la superficie endotelial, a velocidades por debajo de la corriente de flujo sanguíneo, pueden llegar a los tejidos.

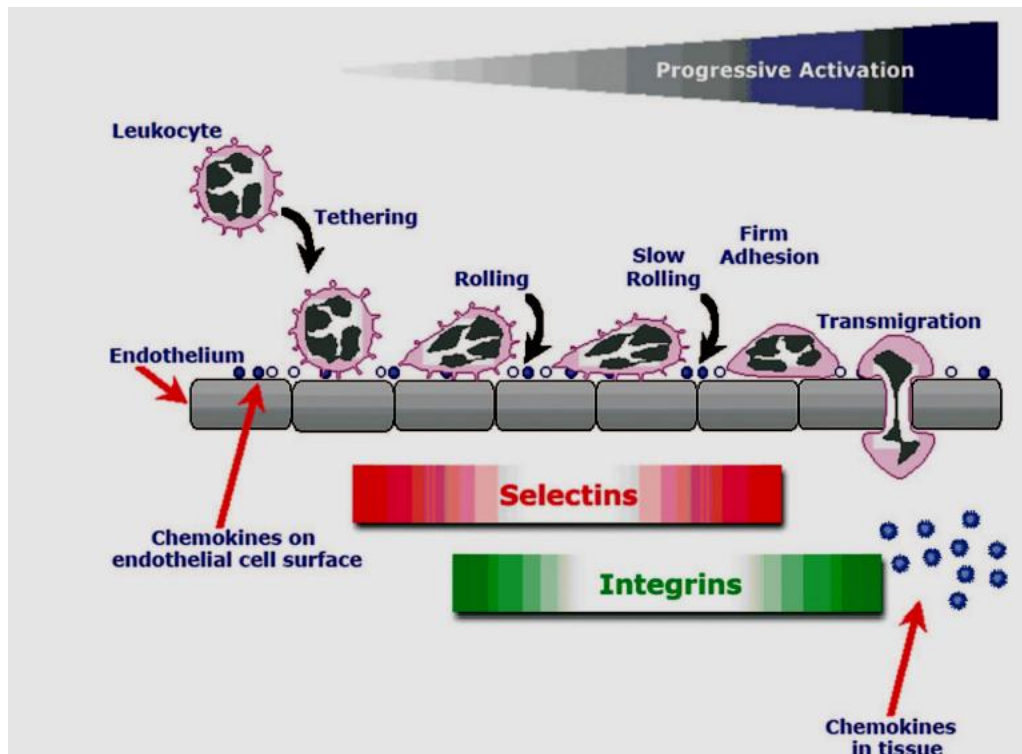


Figura 5. Proceso de migración de un leucocito del torrente sanguíneo hacia un foco inflamatorio. Imagen tomada de Chamberlain G et al 2007.

Por lo tanto, las estrategias para mejorar los efectores del Paso 1 son esenciales para el reclutamiento de las células en los sitios donde se necesitan. Las selectinas son los efectores más potentes del Paso 1 y puede mantener el rodamiento sometidas a fuerzas de cizalla más altas que cualquier otra estructura (192). Las selectinas son también los únicos que muestran unión óptima a sus ligandos bajo fuerzas de cizallamiento en condiciones fisiológicas, de hecho, la L-selectina no se adhería a cualquiera de sus contra-receptores en condiciones estáticas (196–199).

2.2. SELECTINAS.

La expresión de selectinas varía dependiendo del tipo de célula, la localización anatómica, el estado de activación de la célula, y la presencia o ausencia de inflamación. L-selectina se expresa sobre los leucocitos maduros y en células madre hematopoyéticas, pero su expresión está ausente en etapas intermedias de desarrollo de leucocitos (200–203). Entre los linfocitos, L-selectina se expresa característicamente sobre las células T vírgenes y células de memoria centrales, pero su expresión es generalmente baja en las células T efectoras (204). Se cree que la expresión del gen de L-selectina es constitutiva en las células que lo expresan, pero la regulación transcripcional y post-transcripcional está inducida por citoquinas (205,206).

Sin embargo, tanto para P-selectina como para E-selectina el mecanismo de expresión en la superficie celular es inducido con la excepción de la microvasculatura de la piel y médula ósea (207–209), donde P-selectina y E-selectina son constitutivamente expresadas. Es bien reconocido que la expresión permanente de P y E-selectina en la microvasculatura de los huesos y la piel

soporta el estado estacionario del tráfico de células circulantes a estos sitios (210). Sin embargo, en todos los microvasos (incluyendo los de la piel y la médula ósea), el aumento de estas selectinas vasculares es una característica crítica de toda respuesta inflamatoria y su unión a contrarreceptores celulares es un requisito para que tenga lugar la extravasación celular. Es importante destacar que la inflamación induce diferentes cinéticas de expresión de P y E-selectina (211–213) y que esta inducción está marcadamente regulada por citoquinas inflamatorias tales como TNF- α y IL-1 (214). De las tres selectinas, las interacciones de unión mediadas por E-selectina poseen la mayor resistencia al desprendimiento bajo cizalla (adhesión más fuerte) y la velocidad de laminación es más lenta (215–218). Es importante destacar que estudios in vivo en ratones deficientes en E-selectina han definido un papel único para esta selectina en el reclutamiento de leucocitos durante el proceso inflamatorio. Estudios de microscopía muestran que los ratones deficientes en E-selectina han aumentado notablemente los tiempos de tránsito de leucocitos a través de los vasos tras ser tratados con TNF- α , y que la velocidad de rotación mediada por E-selectina es lenta, reduciendo notablemente los tiempos de tránsito, lo que permite respuestas óptimas a los agentes inflamatorios y/o quimiocinas en el medio local (219,220).

Estos hallazgos implican estrategias para dirigir la migración de las células a los sitios de inflamación o lesión en los tejidos en los seres humanos, lo que sugiere que la optimización de la expresión/actividad de los ligandos de E-selectina en las células necesarias puede mejorar la eficacia de reclutamiento celular en las aplicaciones clínicas de las CSM.

2.3. RECEPTORES DE E-SELECTINA EN LAS CÉLULAS CIRCULANTES.

Las tres selectinas se unen a glicanos sialofucosilados que poseen un ácido siálico terminal específico (también conocido como ácido neuramínico; 'NeuAc') en posición $\alpha(2,3)$ de galactosa (Gal) y una fucosa (Fuc) en posición $\alpha(1,3)$ de N-acetilglucosamina (GlcNAc), a este tetrasacárido se le llama "Sialil Lewis X" (sLe^x; también conocida como CD15s). El núcleo de lactosamina de sLe^x es una unidad de lactosamina "Tipo 2". La unidad de lactosamina isomérica "Tipo 1", también se puede modificar con un ácido siálico en posición $\alpha(2,3)$ de la galactosa y cuando esta estructura contiene una sustitución de fucosa en posición $\alpha(1,4)$ -de N-acetilglucosamina, se le conoce como "sialil Lewis a" (sLe^a): (Fig. 6).

Todas las selectinas pueden unirse tanto a sLe^x como a sLe^a (221–223), pero no todas las células expresan estas estructuras, y algunas células que expresan estas estructuras no se unen a las selectinas. Las unidades de lactosamina "Tipo 2" se expresan característicamente, tanto en humanos como en ratón, en todas las células hematopoyéticas y células madre (tanto adultas como embrionarias) (224). Por lo tanto, el ligando de unión a selectina en estas células será siempre de tipo sLe^x.

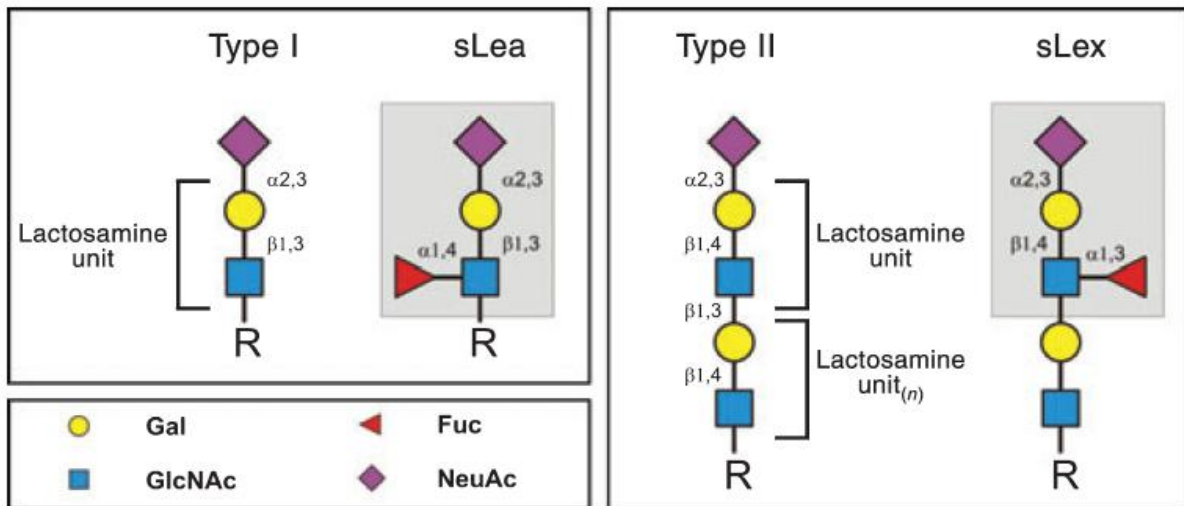


Figura 6. Estructuras de lactosamina Tipo 1 y Tipo 2 y de sLea y sLex. El subíndice (n) que se muestra en la unidad de lactosamina Tipo 2 indica que este disacárido está a menudo presente como una cadena de unidades de repetición (polilactosamina). (Tomado de Sackstein et al, 2009)

El estereoisómero sLea se encuentra típicamente en glicanos expresados en células epiteliales humanas y tumores malignos derivados de las mismas (225–228); de hecho, el marcador más utilizado para el diagnóstico de tumores del tracto gastrointestinal, 'CA19-9', es sLe^a (229). El ligando de la E-selectina es sLe^x y/o sLe^a, mostrando mayor avidez la unión a sLe^x (230), siendo su afinidad 5 y 10 veces mayor que para L-selectina y P-selectina respectivamente (231). En relación con este hecho, se pensaba que la E-selectina se unía de manera indiscriminada tanto al tetrasacárido sLe^x como al sLe^a expresados en las glicoproteínas o glicolípidos. Esta percepción errónea tiene sus orígenes en la historia del antígeno linfocitario cutáneo (CLA), una estructura originalmente identificada por un anticuerpo monoclonal que consistía en una inmunoglobulina M de rata, conocido como HECA452 (232). Estudios anteriores mostraron que la mayoría de los linfocitos en la piel humana, y sólo una pequeña población presente en la circulación o en sitios no cutáneos, reaccionaban con este anticuerpo (233,234); luego el *homing* de los linfocitos de la piel era definido como la expresión de CLA, el epitopo de HECA-452. Estudios posteriores demostraron que las células T CLA⁺ se unían a E-selectina y se obtenía proteína inmunoprecipitada con HECA-452 a partir de linfocitos unido a E-selectina (81, 82), y que HECA-452 se unía tanto a sLe^x y sLe^a (221). Así, la reactividad a HECA-452 se convirtió en sinónimo de la actividad ligando a E-selectina. Estudios bioquímicos posteriores mostraron que el epitopo CLA se encuentra en PSGL-1 (glicoproteína ligando de unión a P selectina) (235,236), proporcionando evidencia directa de que sólo CLA + PSGL-1 puede funcionar como un ligando de la E-selectina, mientras que CLA- y glicofórmulas de PSGL-1 también se unen a P y L-selectina (236).

Hasta la fecha, se han identificado tres glicoproteínas integrales de membrana como principales ligandos E-selectina en células humanas circulantes: CLA (PSGL-1), CD43, y HCELL (235,237–239). PSGL-1 es una glicoproteína homodimérica unida por puentes disulfuro tipo mucina expresada en las células hematopoyéticas tempranas y en todos los leucocitos, y el principal

receptor en leucocitos para P-selectina (240). Como se señaló anteriormente, PSGL-1 es también un ligando de L-selectina, y, como 'CLA', también puede unirse E-selectina; el fenotipo CLA es conferido por extensas modificaciones en O-glicanos (es decir, unidos a residuos de treonina o serina) distribuidos por toda la proteína (241,242). Todos los estudios actuales indican que sLex presente en CD43 sólo se une E-selectina, y que colabora con CLA en la promoción de la migración de las células Th1 al lugar de inflamación de la piel (238,243). **HCELL** es una glicofoma especializado de CD44 expresada predominantemente en células madre hematopoyéticas humanas, y el ligando más potente de E-selectina y L-selectina expresado en células humanas (237,244,245).

HCELL fue identificado inicialmente por criterios operacionales como una glicoproteína integral de membrana capaz de soportar la unión dependiente de L-selectina de linfocitos a células progenitoras hematopoyéticas humanas y líneas celulares hematopoyéticas humanas, como KG1a, sometidas a fuerzas de cizalla (Stamper-Woodruff) (246,247).

3. FUCOSILACIÓN.

3.1. GLICOSILTRANSFERASAS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN SLEX.

La glicosilación post-traducciona l requiere la acción de una serie de glicosiltransferasas presentes en el Golgi que añaden de manera específica unidades de monosacáridos al aceptor glucoconjugado (248). Dentro de los compartimentos del Golgi, se cree que la síntesis de glicanos ocurre como un proceso de línea de montaje, de tal manera que un glicano modificado por la acción de una glicosiltransferasa particular se convierte en el aceptor para una posterior glicosiltransferasa. Estas enzimas son estereoespecíficas, es decir, funcionan para catalizar un enlace glicosídico entre el azúcar de un nucleótido particular, donante (o, en algunos casos, lípido-fosfato-azúcar) y el hidroxilo específico de un aceptor distinto, en un enlace anomérico preciso (α o β). Por consiguiente, las estructuras de glicano que se encuentran en la membrana de cualquier célula son un reflejo directo de la expresión de genes que codifican las glicosiltransferasas relevantes que catalizan los enlaces glicosídicos (249). Durante las últimas dos décadas, se han llevado a cabo multitud de estudios para dilucidar la regulación de la expresión de sLe^x.

Poco después del descubrimiento de E-selectina, se reconoció que la transfección de células no mieloides con $\alpha(1, 3)$ -fucosiltransferasas (creando α 1,3 Fucosa en GlcNAc del extremo terminal de una lactosamina tipo 2) dio lugar a la expresión *de novo* de sLe^x y a la actividad de ligando E-selectina (250,251), lo que indica que los aceptores Tipo 2 sializados se crean en las células que no expresan sLe^x, sugiriendo que la expresión de fucosiltransferasas podría ser limitante en la síntesis de ligandos de E-selectina. Estudios anteriores también mostraron la importancia de la expresión de una $\alpha(1, 3)$ -fucosiltransferasa en la inducción de la actividad ligando de P-selectina por PSGL-1 (241).

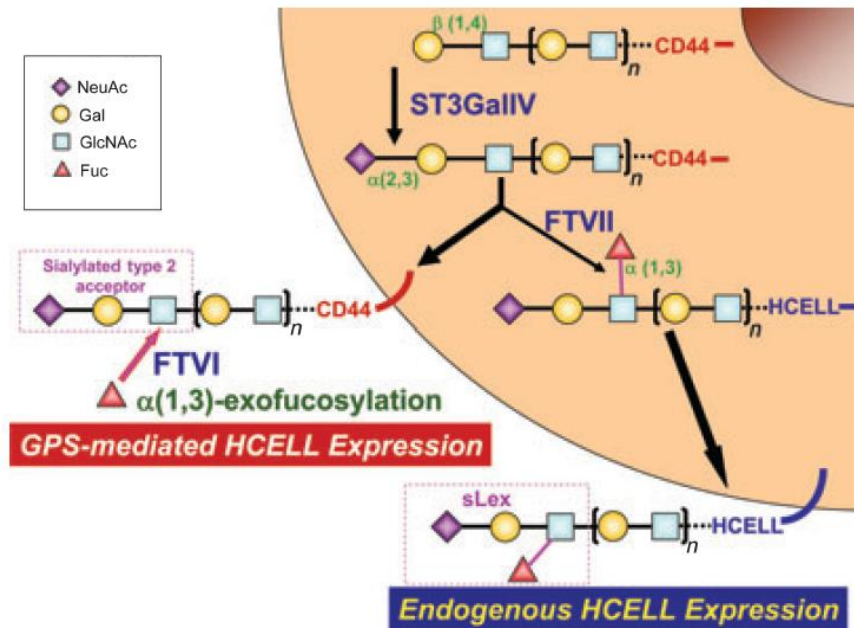


Figura 7. Síntesis endógena del ligando de E y L-selectina en células hematopoyéticas frente a la síntesis exógena de HCELL por Estereosustitución programada con glicosiltransferasas (GPS). Tomada de Sackstein 2012.

En la actualidad, se han validado seis $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasas que pueden modificar lactosaminas terminales, cada una de ellas denominadas con las iniciales FT seguido de un número (es decir FTIII, FTIV, FTV, FTVI, FTVII y FTIX) (252). De estas, FTIII, FTIV, FTV, y FTVI pueden modificar tanto un receptor sializado Tipo 2 y como un receptor Tipo 2 no sializado, produciendo sLe^x o el trisacárido Le^x (también conocido como CD15), respectivamente. Además, FTIII y FTV pueden modificar cada receptor Tipo 1, produciendo Le^a o sLe^a (especialmente FTIII). Dentro de los receptores de FTVII y FTIX, FTVII es específica para el receptor de tipo 2 sializado y FTIX tiene preferencia por receptores no sializados, produciendo sLe^x o Le^x , respectivamente.

De todas las $\alpha(1,3)$ -fucosiltransferasas, sólo FTIV y FTVII se encuentran en los leucocitos. En las líneas celulares transfectadas, se demostró una preferencia de FTIV por los receptores de glicolípidos, mientras que FTVII genera sLe^x predominantemente en glicoproteínas (253). Por otra parte, FTIV tiende a fucosilar residuos de GlcNAc en unidades de lactosamina proximal de las cadenas de polilactosamina, mientras que FTVII actúa específicamente fucosilando sólo el GlcNAc distal y haciéndolo sólo después de la sialización de la Gal (es decir, el único receptor glicano para FTVII es la GlcNAc de una estructura de lactosamina terminal tipo 2 sializada (254).

Se ha descrito que en una persona que lleva una mutación homocigota en el gen FTVII, los neutrófilos de este individuo muestran una dramática disminución en la expresión sLe^x y del marcaje con una quimera de E-selectina por citometría de flujo, pero el marcaje con una quimera de P-selectina es normal (255).

La variedad de citoquinas que median en el desarrollo y la diferenciación de leucocitos afectan también a la expresión de genes de glicosiltransferasas, conduciendo de este modo dis-

cretas modificaciones post-traduccionales de las proteínas y lípidos de la superficie celular. Los primeros estudios revelaron que la expresión de CLA podría ser inducida en las células T humanas *in vitro* por mitógenos de activación en presencia de citoquinas, tales como IL-2 y TGF- β (202).

Estudios *in vitro* usando linfocitos humanos (256–258) y de ratón (259,260) han revelado un patrón general según el cual mitógenos o antígenos del TCR conducen a la activación de las células T en presencia de IL-12 aumentando la expresión FTVII acorde con la inducción de ambos ligandos de E y P-selectina, mientras que la IL-4 puede oponerse a los efectos de la IL-12 en la expresión FTVII y, en particular, en la expresión del ligando de E-selectina.

3.2. EXOGLICOSILACIÓN DE SUPERFICIES CELULARES: CRONOLOGÍA Y RESTRICCIONES.

Como se describió anteriormente, la formación de enlaces glicosídicos *in vivo* depende de la expresión de glicosiltransferasas del Golgi que catalizan reacciones estereoespecíficas en sus aceptores. A finales de 1970, el hallazgo de que las rutas biosintéticas del Golgi podrían ser recapituladas usando glicosiltransferasas *in vitro* (aisladas de fuentes naturales) y el sustrato aceptor relevante (261), junto con la creciente disponibilidad de glicosiltransferasas específicas, llevaron a los investigadores a utilizar estas enzimas como sondas estructurales para caracterizar los oligosacáridos que aparece en las membranas celulares (262). Estos estudios consistían generalmente en el tratamiento de células diana con una glicosidasa específica (por ejemplo sialidasa) para exponer potenciales aceptores oligosacáridos, seguido por la reglicosilación utilizando la glicosiltransferasa pertinente (por ejemplo, α (2, 3)-sialiltransferasa) junto con nucleótidos radiomarcados donantes de azúcar seguido por SDS-PAGE y autorradiografía para identificar las proteínas de la membrana celular exoglicosiladas (263). Además de la información sobre los tipos de proteínas que llevan sustituciones en los monosacáridos pertinentes, estas investigaciones permitieron también analizar las estructuras de glicano y asignar la especificidad de unión al carbohidrato, como sucede entre los anticuerpos y los oligosacáridos de los antígenos (262) o patógeno (virus / bacterias) y los oligosacáridos de la célula diana (264,265). Aunque estas primeras investigaciones demostraron que la modificación de los glicanos de la superficie celular era factible, estas reacciones enzimáticas han sido optimizadas bioquímicamente, pero no para preservar la fisiología celular (266,267). De hecho no había ninguna evaluación formal de la citotoxicidad, estado funcional de la célula o del fenotipo celular después del tratamiento con glicosidasa o exoglicosilación (264,268). Hasta la década de 1990, la manipulación enzimática de glicanos, presentes en la superficie celular o en solución, era realizada a pequeña escala debido a las limitaciones de aislamiento de glicosiltransferasas de fuentes naturales (269). Estas modificaciones podrían también conseguirse por síntesis orgánica, pero es un proceso laborioso de baja eficiencia ya que requieren de bucles de protección-desprotección para lograr estereoespecificidad, y que implica el uso de reactivos tóxicos y riesgo ambiental. En las últimas dos décadas, la creciente facilidad de generar glicosiltransferasas recombinantes ha hecho posible la biocatálisis de glicanos a gran escala, creándose una plataforma tecnológica emergente para la modificación

de carbohidratos estereoespecíficamente para la aplicación clínica de glicoconjugados. Por ejemplo, en la producción de glicoproteínas recombinantes como reactivos terapéuticos tales como anticuerpos monoclonales humanizados, la capacidad de modificar los glicanos postproducción tiene enormes implicaciones para estabilidad de la proteína y su bioactividad (270). Una consideración fundamental en la ingeniería de glicanos ex vivo de la superficie celular es que varias clases de glicosiltransferasas requieren un catión divalente, el más eficaz manganeso (Mn^{2+}), para llevar a cabo su actividad catalítica (271). Los cationes divalentes, en particular manganeso, son conocidos por activar las integrinas (por ejemplo LFA-1 y VLA-4) a concentraciones molares muy por debajo de los necesarios para activar las reacciones de glicosiltransferasas (272–275). La adhesión firme dependiente de la acción de las integrinas podría causar un paro irreversible de las células en la superficie endotelial, impidiendo la migración celular e impactando en los patrones del tráfico celular. Además, la exposición al manganeso induce transducción de señales (276,277) y, lo más importante, la muerte celular apoptótica (277,278) a concentraciones sustancialmente más bajas que la necesaria para activar glicosiltransferasas. La fucosilación de células primarias aisladas de médula ósea con FTVI comercial (Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) produjo un aumento de la expresión de sLe^x acompañado por elevada muerte celular. Esta muerte fue inducida por la presencia del manganeso en el tampón (244).

La microvasculatura de la médula ósea expresa constitutivamente E-selectina colocalizada con la selectina CXCL12 (SDF-1) (279). Las células progenitoras hematopoyéticas migran de la médula ósea por la expresión de ligandos de E-selectina y CXCR4 (receptor para CXCL12) (210). De hecho, un informe sugiere que la α (1,3) fucosilación mejora el injerto de células progenitoras hematopoyéticas humanas en ratones inmunodeprimidos comparado con aquellos infundidos con células tratadas sólo con el buffer pero no se analizó el injerto con células sin tratar (280). Por tanto, aunque la actividad ligando de E-selectina forzada por α (1,3) fucosilación promueve las interacciones del Paso 1 en la microvasculatura medular, las células progenitoras hematopoyéticas eran funcionalmente incapaces de migrar a través del endotelio a causa de la muerte celular, acompañada quizá por un aumento de adhesión firme en la superficie del endotelio secundario a la activación de las integrinas inducida por Mn^{2+} .

Por lo tanto, para superar estas limitaciones fundamentales se ha desarrollado una enzima FTVI cuyas condiciones de reacción preservan el fenotipo celular y la viabilidad, logrando los efectos biológicos de la expresión forzada de HCELL: mejorar el tráfico de células funcionalmente intactas de la vasculatura a los tejidos donde sea necesario. A esta tecnología se le denomina “Estereosustitución glicosiltransferasa programada” GPS (*Glycosyltransferase Programmed Stereosubstitution*).

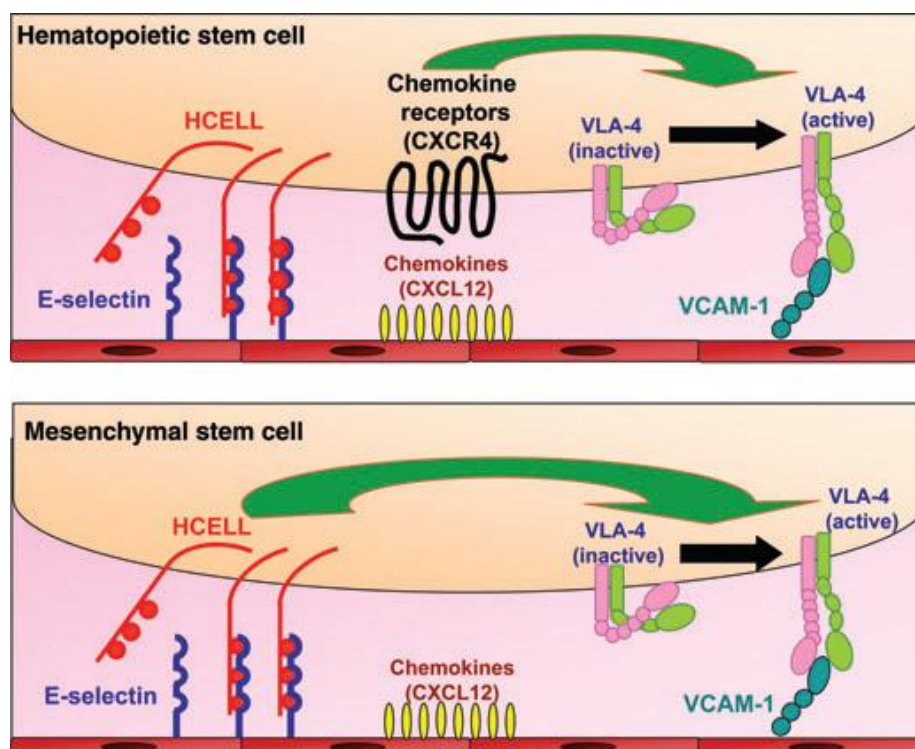


Figura 8. Componentes moleculares de las células madre hematopoyéticas humanas y de las CSM en la interacción con el endotelio de la microvasculatura ósea. Se muestran los efectores moleculares relevantes para el homing celular en la médula ósea. Esquemática del *by pass* de células madre mesenquimales carentes de receptores de quimiocinas. Imagen tomada de Sackstein 2009.

3.3. DESARROLLO DE GPS Y PRUEBAS DE SU EFICACIA EN EL TRÁFICO CELULAR.

El primer objetivo en el desarrollo del GPS era producir una elevada cantidad de FTVI humana recombinante suspendida en un tampón de biológicamente compatible, preferentemente carente de estabilizadores. Esto se logró mediante el uso de sistemas de expresión en *Pichia pastoris* y la formulación final de la FTVI recombinante en tampón HBSS (244). A continuación, se optimizaron las condiciones de la reacción enzimática a fin de evitar la entrada cationes bivalentes: múltiples buffers fueron probados en diferentes tipos celulares, y la mayor eficiencia de α (1, 3) -fucosilación en las superficies celulares en variedad de tipos celulares humanos (y hematopoyético no hematopoyético) se logró utilizando HBSS como tampón de reacción (244). La fucosilación forzada utilizando esta formulación específica no tuvo efectos sobre la función o la viabilidad celular.

Para probar la eficacia de GPS en dirigir el tráfico celular (244) se empleó un modelo de xenoinjerto, con CSM humanas infundidas por vía intravenosa en ratones. Esta idea surgió de los ensayos clínicos a finales de 1990, que demostraron que pacientes que sufren osteogénesis imperfecta pueden obtener un beneficio terapéutico transitorio con el trasplante alogénico de trasplante de MSC humanas (281,282). La osteogénesis imperfecta es un trastorno óseo genético, autosómico dominante, caracterizado por huesos extremadamente frágiles debido a la producción de colágeno anormal por los osteoblastos (que son progenie de CSM), con el resultado

de una matriz esquelética anormal. En todos los pacientes con osteogénesis imperfecta sometidos a trasplante alogénico de CSM, la fracción de los osteoblastos derivados de la médula del donante fue muy baja (no superior al 2%), con fugaz beneficio en el desarrollo osteoide (281,282). Esto condujo al desarrollo de estudios bioquímicos sobre las CSM humanas para comprender la base molecular de este defecto de *homing*. El análisis de la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas en CSM humanas revelaron que estas células no expresan los principales efectores moleculares de la migración a la médula que son expresado en células madre hematopoyéticas humanas, los ligandos de E-selectina y CXCR4 (244) (Figura 8). Asimismo, se observó que las MSC humanas no expresan PSGL-1, LFA-1 o LPAM-1. Sin embargo, expresan CD44 y VLA-4; la expresión de VLA-4 es importante porque la vasculatura ósea también expresa constitutivamente su ligando afin, VCAM-1 (207–209,279) (Fig. 8). El análisis de citometría de flujo de MSC humanas utilizando un panel de anticuerpos dirigidos a glicoformas de CD44 reveló que estas células carecen de reactividad con HECA-452. Estos resultados indicaron que la ausencia de la expresión de HCELL en CSM humanas se debe a la falta de una modificación α (1, 3)-fucosa que da lugar a sLe^x. Se llevó a cabo adición de α (1, 3)-fucosa de la superficie de la célula y se observó aumento de reactividad a HECA-452. El western blot mostró que la única glicoproteína de membrana revelada con HECA-452 era CD44, lo que indica, que la glicoforma sializada de CD44 se convirtió en HCELL (244). La expresión de HCELL fue transitoria (estable durante aproximadamente 24 h), con la pérdida por reemplazo de proteínas de la superficie de la célula. La expresión artificial de HCELL confirió interacciones de unión mas robustas con la E-selectina endotelial bajo condiciones de cizallamiento de fluido, mostrando unión a E-selectina resistente por encima 30 dinas /cm² (un nivel de tensión de cizalla de aproximadamente 10 veces mayor que en las vénulas postcapilares). La infusión intravenosa de CSM HCELL- mostró mínimas interacciones con los vasos de la médula ósea mientras que la infusión de MSC HCELL+ favorecía las interacciones en la microvasculatura ósea y la transmigración al parénquima medular murino a pesar de la ausencia de expresión de CXCR4.

3.4. GPS: REVISIÓN DEL PARADIGMA EN MÚLTIPLES PASOS E IMPLICACIÓN EN LA TERAPIA CELULAR.

El hallazgo de que la expresión forzada de HCELL en CSM humanas media las interacciones del paso 1 dependientes de E-selectina dirigiendo el *homing* a médula ósea en ausencia del receptor CXCR4 sugiere que la regulación positiva por citoquinas de las adhesiones por integrinas puede no ser indispensable para la transmigración. Mientras que la expresión de receptores de quimiocinas en CSM humanas sigue siendo polémica (283–285), la expresión del efector VLA-4 y su papel en la migración transendotelial de CSM es consistente (129,286,287). Los datos aportados por Sackstein et al (244) proporcionan evidencia directa de que la expresión de un efector del Paso 1 (HCELL) en células que expresan VLA-4 puede permitir la conducción transendotelial en los sitios donde la E-selectina y VCAM-1 son coexpresados. El compromiso de las moléculas de la etapa 1 (es decir, en ausencia de efectores de la etapa 2) puede ser suficiente para inducir

la adhesión por integrinas, acompañado de adherencia firme y migración transendotelial. Aunque CD44 fue identificado por primera vez por su papel en la unión a estructuras de la matriz extracelular (288,289), otros estudios posteriores proporcionaron evidencia bioquímica convincente de que la cola citoplasmática de CD44 promueve la formación de un complejo bimolecular con VLA-4, por lo que la interacción con CD44 provoca la regulación positiva sinérgica de la adhesión por VLA-4, que conduce a la migración transendotelial en ausencia de quimiocinas (290–292). Las citoquinas IL-1 y TNF α inducen la expresión de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, y la expresión de estas tres moléculas de adhesión es esencial en el endotelio de los sitios de inflamación o tejidos dañados (214,293–295). Como la expresión de CD44 es un rasgo característico de células madre (tanto adultas como embrionarias) y de linfocitos y NK, la expresión de HCELL mediada por GPS en estas células las capacitaría para migrar e infiltrarse pudiéndose aplicar en variedad de condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo la medicina regenerativa, enfermedades infecciosas, enfermedades inmunes y cáncer. Por otra parte, el uso de GPS para optimizar la transferencia vascular de células madre progenitoras para la regeneración de los tejidos puede ser la única opción para órganos o tejidos en los que la inyección local de tales células es poco práctica (por ejemplo, los pulmones). En las enfermedades infecciosas, la mejora del tráfico de linfocitos antígeno-específicos expandidos in vitro podría mejorar la eficacia de la inmunoterapia (por ejemplo para las infecciones por citomegalovirus posteriores al trasplante alogénico de células hematopoyéticas (296,297)). Para enfermedades inmunes, la capacidad de promover selectivamente la migración de linfocitos reguladores expandidos en cultivo a sitios de inflamación podría aumentar la tolerancia periférica y re-establecer la homeostasis inmune (298,299). Del mismo modo, en la terapia del cáncer, el potencial de GPS para mejorar la infiltración tumoral de células T antígeno-específicas expandidas podría aumentar la eficacia de este enfoque terapéutico (300). Es importante destacar que la expresión forzada de HCELL en la superficie celular es transitoria, con reversión al fenotipo CD44 endógeno en las 48 horas posteriores a la fucosilación (244). Luego las células, una vez extravasadas, volverían a manifestar su CD44 natural. En CSM, el CD44 es la única proteína que contiene el glicano aceptor pertinente, pero también se encontraron evidencias en menor proporción del aporte de los glicolípidos a la actividad ligando de E-selectina después del tratamiento con FTVI (244).

En los estudios previos de α (1,3) fucosilación de las células, no hay datos bioquímicos respecto a cuáles son las glicoproteínas diana de la reacción (280,301–304), pero se encontró que los glicolípidos pueden aumentar la unión a E-selectina (303). Por lo tanto, la capacidad de producir HCELL en la superficie celular por modificación de los glicanos de CD44 en células que coexpresan VLA-4 debe permitir el tráfico a través de la vasculatura hacia cualquier zona de daño tisular. Sin embargo, en aquellos casos donde la densidad de HCELL y/o VLA-4 en la célula es baja o donde la densidad de sitios de unión a E-selectina y/o VCAM-1 son bajos, son obligatorias las quimiocinas y otros efectores del Paso 2 para lograr la extravasación pero la presencia de HCELL/VLA-4 reduciría el umbral de quimiocinas necesario para la primera adhesión firme y transmigración.

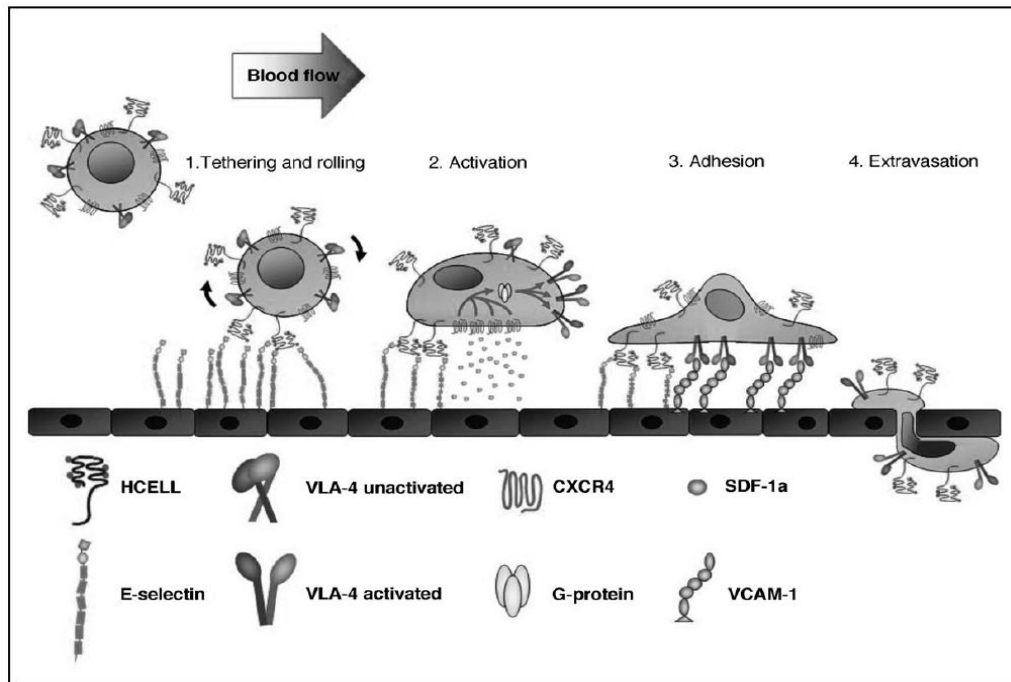


Figura 9. Representación esquemática de los múltiples pasos en la migración celular desde el compartimento vascular a los compartimentos extravasculares. Paso 2: la activación de la integrina a través de quimioquinas confiere selectividad en el reclutamiento de células, dependiendo de la quimioquina que se presente en el lecho endotelial y el receptor (s) de quimioquina expresado por la célula circulante. Se representa la visión convencional de homing celular a la médula: tras la inmovilización inicial por el contacto de la célula rodando por el endotelio (paso 1), el receptor de quimioquinas CXCR4 se une a su ligando CXCL12 (SDF-1), con lo que se produce activación de la proteína G acoplada VLA-4 (paso 2), con la posterior adherencia firme (paso 3) y la transmigración (paso 4). Sackstein 2011.

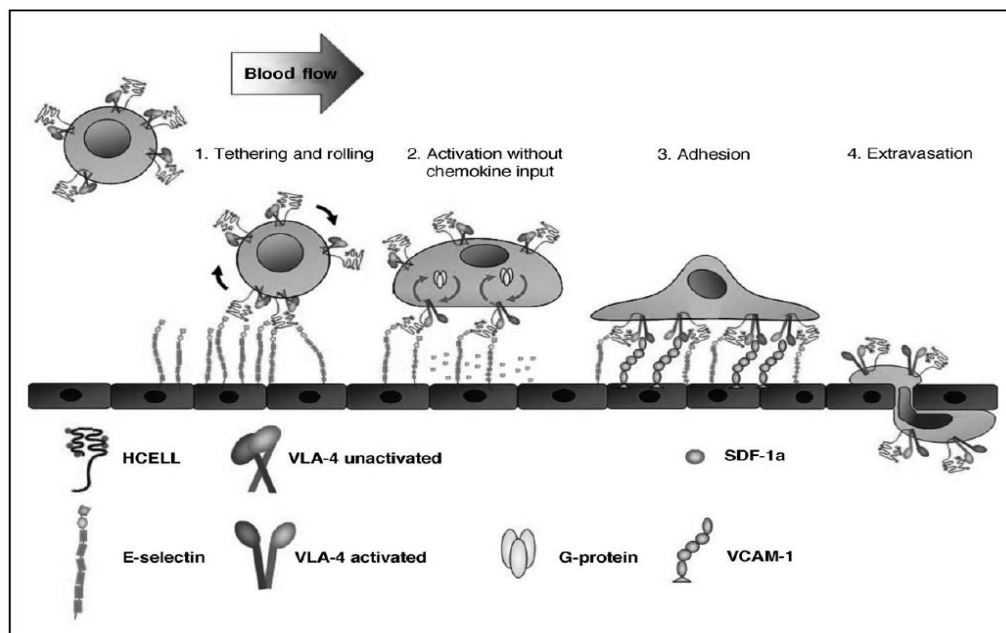


Figura 10. Representación esquemática de los pasos en la migración celular de las células circulantes que expresan HCELL junto con VLA-4 cuando se encuentran en zonas endoteliales que expresan E-selectina y VCAM-1. En comparación con la vía canónica (ver Fig. 9), la activación de VLA-4 (paso 2) se produce a través de mecanismos de señalización mediado por proteínas G provocados por la unión de HCELL a E-selectina (y / o unión de CD44 al ácido hialurónico endotelial), evitando la necesidad de entrada de quimioquinas. Imagen tomada de Sackstein 2011.

4. TERAPIAS AVANZADAS.

4.1. DEFINICIONES.

Los medicamentos de terapia avanzada son medicamentos de uso humano basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces. Enfermedades como el cáncer, diabetes, isquemia crítica crónica, infarto de miocardio, parkinson, etc, están siendo diana de estudio, en búsqueda de una alternativa a la mejora de la salud de estos pacientes.

Es importante conocer bien la normativa existente en terapias avanzadas, para poder realizar la traslación de las investigaciones básicas realizadas en laboratorios de investigación, a la clínica, llevada a cabo en laboratorios específicos de producción celular. El Consejo de la Unión Europea (UE) ha aprobado el Reglamento (CE) N° 1394/2007 (305) sobre terapias avanzadas propuesto por el Parlamento Europeo, con el objetivo de crear un solo marco legal que englobe la terapia génica, la terapia somática celular y la ingeniería de tejidos, ya que su desarrollo, debido a los progresos científicos en biotecnología celular y molecular, es muy rápido. De esta manera se ha creado un Comité para Terapias Avanzadas (CAT), que es un comité multidisciplinario que incluye la participación de los mejores expertos de la UE para evaluar la calidad, seguridad y eficacia de medicamentos de terapia avanzada, previamente aprobado por el Comité de Productos Medicinales de Uso Humano de la agencia europea del medicamento (EMA), así como para hacer un seguimiento de los principales avances en este sector. Con la emergencia de las nuevas tecnologías, el concepto de fármaco según la OMS como “toda sustancia química que, introducida voluntariamente en el organismo de un sujeto, posee la propiedad de modificar las condiciones físicas o químicas de éste” será cada vez más amplio, existiendo medicamentos clásicos como los comprimidos junto con la innovación de la infusión de células humanas consideradas desde el año 2007 medicamentos. Las definiciones desde un punto de vista regulatorio de estos medicamentos se encuentran en el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada (305) (capítulo 1, artículo 2) y en la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 6 noviembre de 2001 (306) por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano (anexo I, parte IV, según su última modificación).

4.1.1. Medicamento de terapia génica.

Se considera medicamento de terapia génica, al producto obtenido mediante un conjunto de procesos de fabricación destinados a transferir, *in vivo* o *ex vivo*, un gen profiláctico, de diagnóstico o terapéutico, tal como un fragmento de ácido nucleico, a células humanas/animales y su posterior expresión *in vivo*. La transferencia genética supone un sistema de expresión conte-

nido en un sistema de distribución conocido como vector, que puede ser de origen viral o no viral. El vector puede incluirse asimismo en una célula humana o animal. Los medicamentos de terapia génica no incluyen las vacunas contra enfermedades infecciosas.

4.1.2. Medicamento de terapia celular.

Se considera medicamento de terapia celular somática la utilización en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas, procedentes del propio paciente, como alogénicas, procedentes de otro ser humano, o xenogénicas, procedentes de animales, cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas *ex vivo*, tal como la inmunoterapia adoptiva, y la utilización de células alogénicas y xenogénicas asociadas con productos sanitarios empleados *ex vivo* o *in vivo*, tales como microcápsulas, matrices y andamiajes intrínsecos, biodegradables o no biodegradables. No se considerarán manipulaciones sustanciales las enumeradas a continuación (anexo I del Reglamento (CE) nº 1394/2007):

- Corte.
- Trituración.
- Moldeo.
- Centrifugación.
- Imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas.
- Esterilización.
- Irradiación.
- Separación, concentración o purificación celular.
- Filtrado.
- Liofilización.
- Congelación.
- Criopreservación.
- Vitricación.

4.1.3. Medicamento de Ingeniería de tejidos.

Un producto de ingeniería tisular se considera a aquel que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y del que se alega que tiene propiedades. Su fin es regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano. Un producto de ingeniería tisular podrá contener células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Las células o tejidos podrán ser viables o no. Podrá también contener otras sustancias, como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices. Quedan excluidos de la presente definición los productos que contienen o están formados exclusivamente por células y/o tejidos

humanos o animales no viables, que no contengan células o tejidos viables y que no ejerzan principalmente una acción farmacológica, inmunológica o metabólica.

4.1.4. Medicamento combinado de terapia avanzada.

Medicamento combinado de terapia avanzada será aquel que su parte celular o tisular tiene que contener células o tejidos viables, o que su parte celular o tisular contenga células o tejidos no viables ejerciendo en el organismo humano una acción que pueda considerarse fundamental respecto de la de los productos sanitarios mencionados.

Actualmente la mayoría de las producciones de terapias avanzadas están encaminadas a la producción de células humanas, enmarcándose en un ámbito no de comercialización si no de I+D+I. Los primeros pasos en el desarrollo de terapias avanzadas se dan en investigación básica y preclínica, sobre estudios de toxicidad y evaluación de la actividad biológica. En la traslación de la investigación básica a la clínica, hay que tener en cuenta varios factores que concurren en las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de uso Humano y veterinario: protocolos de producción y control de calidad, instalaciones, personal y proceso. El propietario de una autorización para comercializar medicamentos de terapia avanzada deberá garantizar un sistema que asegure que cada producto y sus componentes puedan ser examinados durante el proceso de obtención, fabricación, envasado, almacenado, transporte y entrega. Sea cual fuere el fin, ensayo clínico o comercialización, la producción de estos medicamentos debe realizarse en un marco legislativo donde las células, genes y tejidos son considerados medicamentos. Por lo que se requieren laboratorios específicos de producción de medicamentos de terapia celular debiéndose regir por lo establecido en la Directiva 2003/94/CE de la Comisión, de 8 de octubre de 2003, por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano (307). Además, existen directrices específicas para los medicamentos de terapia avanzada, que reflejen adecuadamente el carácter particular de su proceso de fabricación (Reglamento (CE) No 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre Medicamentos de Terapia Avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) no 726/2004)(305).

4.2. MEDICAMENTOS DE TERAPIA CELULAR.

4.2.1. Producción.

Las Normas de Correcta Fabricación (NCF) son las directrices fundamentales que definen los estándares de calidad en la fabricación de medicamentos y de obligado cumplimiento para la industria farmacéutica. Las NCF, elaboradas por la Agencia Española del Medicamento (AEMPS) son la transposición de la normativa europea en vigor (Good Manufacturing Practices o GMP dictada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA)(308). Si tenemos en cuenta que la terapia celular está sujeta a la regulación de los medicamentos, la validación de una terapia celular

para uso clínico asistencial debe demostrarse en modelos pre-clínicos y clínicos con sus correspondientes fases de desarrollo. Además de este reto de aplicar la metodología científica de los medicamentos a la validación de una terapia celular, la aplicación en clínica humana plantea otros dos nuevos retos: la elaboración a escala clínica y la garantía de calidad.

La elaboración de productos terapéuticos a escala clínica supone un cambio sustancial en los procedimientos. Se hace necesario aumentar entre cien y mil veces el número de células, el volumen de tejido, las cantidades absolutas de materias primas, las superficies de cultivo, etc. Con ello, han de cambiar los sistemas de cultivo, selección, purificación, concentración y cualquier otro proceso que interviene en la elaboración del producto. Hay que recurrir a dispositivos adaptados a esta escala, lo que en la mayoría de las ocasiones supone el diseño de un nuevo proceso o el desarrollo de nuevas aplicaciones de aparatos o sistemas de manipulación potencialmente adecuados, pero diseñados para otros usos.

Por otra parte, la elaboración de un producto terapéutico humano supone asumir un exhaustivo sistema de garantía de calidad que permita minimizar los riesgos para los pacientes y asegurar el rigor de los datos obtenidos. La elaboración de productos de terapia celular y tisular ha sido regulada en la Unión Europea por las directivas 2004/23/CE, 2006/17/CE y 2006/86/CE, transpuestas a la legislación española por el RD 1301/2006 (309–312). En estas normativas, al igual que en otras que regulan la fabricación industrial de medicamentos y productos terapéuticos, se establecen estrictas medidas de control ambiental para los procesos de elaboración realizados en exposición abierta. En concreto, se hace preceptiva la manipulación en un entorno de flujo laminar de aire estéril ultrafiltrado dentro de costosas instalaciones y de muy exigente mantenimiento (las “salas blancas”).

Un condicionante de gran importancia en la elaboración de productos de terapia celular es su carácter de tratamiento individualizado. En la inmensa mayoría de las ocasiones, se trata de productos terapéuticos elaborados “a la carta”, para un paciente concreto, a menudo de origen autólogo (células o tejidos del propio paciente modificados) o dirigidos desde un donante concreto compatible. La fabricación de estos productos, por tanto, se hace prácticamente paciente a paciente y dosis a dosis, una dinámica de producción muy alejada de la fabricación industrial farmacéutica, que es la que permite la viabilidad y la implantación de las normas GMP de correcta fabricación originales.

4.2.2. Instalaciones.

La fabricación de productos estériles (terapias avanzadas) debe llevarse a cabo en zonas limpias. El acceso a estas zonas se realiza a través de exclusas reservadas para el personal y/o los equipos y materiales. Las instalaciones deben mantener un nivel de limpieza adecuado y han de estar dotadas de un exhaustivo control de la calidad del aire.

Estas instalaciones se denominan salas blancas, salas GMP o salas limpias. Una **sala blanca** es una sala especialmente diseñada para obtener bajos niveles de contaminación. Estas salas

tienen los parámetros ambientales estrictamente controlados: partículas en aire, temperatura, humedad, flujo de aire, presión interior del aire e iluminación. En todos los sistemas de acondicionamiento de aire, el sistema de filtración a seleccionar debe prever la retención apropiada de las partículas procedentes del exterior.

El riesgo de contaminación cruzada debe ser necesariamente evaluado para diseñar correctamente la sala blanca. Se suele identificar como sala blanca aquella en la que los parámetros enumerados a continuación se mantienen alrededor de los valores de consigna con márgenes de variación muy estrechos sean cuales sean las condiciones exteriores y el proceso de producción que se realice en su interior:

- Número y dimensiones de partículas en el aire.
- Temperatura seca y distribución de la misma.
- Temperatura húmeda y distribución de la misma.
- Flujo de aire: velocidad y dirección, así como su distribución en la sala.
- Presión interior del aire y su distribución.
- Geometría y acabados interiores.
- Iluminación.
- Protección contra incendios.
- Protección electrostática.

Las salas blancas se clasifican por el grado de pureza del aire interior o por el flujo del aire. Por el tipo de flujo, las salas blancas se agrupan en flujo multidireccional y unidireccional. En el primero el régimen de movimiento del aire es turbulento mientras que en el segundo es laminar.

Se debe definir un gradiente de presiones en escala ascendente o descendente, según se defina el proceso a realizar. En el caso de la fabricación estéril, el gradiente de presiones de cada uno de los compartimentos será de menor a mayor en intervalos de 10-15 pascales positivos. Si por el contrario el producto a procesar es vírico y la prevención es que no salga contaminación, el juego de presiones deberá ser a la inversa, negativas y en gradiente ascendente.

La Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario en su Anexo I, define que la fabricación de productos estériles está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de pirógenos (308).

Las salas blancas para la fabricación de productos estériles se clasifican en diferentes entornos según las características requeridas del aire. Cada operación de fabricación exige un grado adecuado de limpieza del entorno en estado de funcionamiento para minimizar los riesgos de contaminación microbiana o de partículas en el producto o los materiales que se estén manipulando. A fin de cumplir las condiciones “en funcionamiento”, estas zonas deben diseñarse de

forma que alcancen ciertos niveles especificados de limpieza del aire cuando estén “en reposo”. La situación “en reposo” es aquella en que la instalación está completa con el equipo de producción instalado y en funcionamiento pero sin que esté presente el personal. La situación “en funcionamiento” es aquella en que la instalación está funcionando de la forma definida de trabajo con el número de personas definidas trabajando. Los estados “en funcionamiento” y “en reposo” deben estar definidos en cada sala blanca o zona de salas blancas. Para la fabricación de medicamentos estériles se distinguen cuatro grados:

- Grado A: zona local donde se realizan operaciones específicas de alto riesgo tales como la zona de llenado, de bandejas de tapones, de ampollas y viales abiertos y de realización de conexiones asépticas
- Grado B: entorno para la zona de grado A en el caso de preparación y llenado asépticos.
- Grados C y D: zonas limpias para realizar fases menos críticas de la fabricación de productos estériles.

Las salas blancas y los dispositivos de aire limpio deben clasificarse según la norma ISO 14644-1 (313), en categorías de limpieza en cuanto a las partículas en el aire para las salas blancas y las zonas limpias. Las instalaciones de una sala blanca deben presentar compartimentos mínimos: Zona de entrada, Almacén, Vestuario sucio, Vestuario limpio, Distribuidor estéril, Sala de Producción, Laboratorio de control de Calidad.

4.2.3. Personal.

El establecimiento y mantenimiento de un sistema satisfactorio de Garantía de Calidad y la correcta fabricación de medicamentos depende de las personas. Por esta razón, debe haber suficiente personal cualificado para realizar todas las tareas que corresponden al fabricante. Cada persona debe comprender claramente que responsabilidades le son atribuidas y estas responsabilidades deberán figurar en instrucciones escritas. Todo el personal debe conocer las Normas de Correcta Fabricación que le afecten y debe recibir formación inicial y continuada, incluyendo instrucciones referentes a la higiene, según sus necesidades. Un laboratorio de producción celular debe disponer del personal suficiente y con la cualificación técnica necesaria para garantizar la calidad de las especialidades fabricadas y la ejecución de los controles procedentes.

Los responsables de Producción y de Control de Calidad deben ser mutuamente independientes. El fabricante debe asegurar la formación de todo el personal cuyo trabajo se desarrolle en zonas de producción o en laboratorios de control (incluyendo al personal técnico, de mantenimiento y de limpieza), y la de cualquier otro personal cuyas actividades puedan afectar a la calidad del producto. Anualmente se establecerá un plan de formación en cada una de las secciones, que es coordinado por la Dirección Técnica. En el plan de formación anual están incluidos los cursos externos que los responsables de departamento soliciten para su personal o para ellos. Las previsiones adoptadas para asegurar que ninguna persona afectada de enfermedad

infecciosa o con una lesión abierta en la superficie corporal expuesta esté encargada de la realización de tareas de fabricación de medicamentos son:

- Revisiones anuales médicas del personal que participa en la producción.
- Revisión diaria por parte de los Responsables de Producción y de Control de Calidad de la disponibilidad de los trabajadores según su estado de salud e higiene personal.

4.2.4. Validación del proceso productivo.

Consiste en la obtención de pruebas, con arreglo a las NCF (314), de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto. Pretende establecer evidencia documental que demuestre, con un alto grado de certeza, que un proceso específico produce consistentemente un producto que cumple con sus especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos. La validación no solo comprende la realización y ejecución de pruebas que permitan verificar el comportamiento de cualquier elemento, sino que es una filosofía de Calidad que permite garantizar fabricaciones repetitivas y acorde a los estándares de calidad. Es un imperativo Legal desde el año 1992 y de obligado cumplimiento en la Unión Europea validar los sistemas, equipos y procedimientos.

El proceso de validación es un proceso continuo en el tiempo que no tiene fin. Una vez que el sistema se encuentra validado es necesario el mantenimiento de dicho estado en el tiempo. La validación no solo comprende aquellos documentos necesarios para demostrar la correcta operativa de los sistemas, sino que también es necesario verificar que los procedimientos necesarios para el correcto uso de los mismos han sido desarrollados.

Los estudios de validación deberán reforzar las Normas de Correcta Fabricación (314) y se realizarán con arreglo a procedimientos definidos donde quedarán registrados sus resultados y conclusiones. Cuando se adopte una nueva fórmula de fabricación o método de preparación, deberán tomarse medidas para demostrar su idoneidad para la elaboración rutinaria. Deberá demostrarse que el proceso definido, utilizando los materiales y el equipo especificados, origina un producto que presenta de forma homogénea la calidad requerida. Deberán validarse las modificaciones importantes del proceso de fabricación incluyendo cualquier cambio en el equipo o en los materiales que puedan afectar a la calidad del producto y/o a la reproducibilidad del proceso. Los procesos y procedimientos deberán ser objeto de revalidación periódica de forma crítica para garantizar que siguen siendo capaces de proporcionar los resultados previstos.

Los protocolos son los documentos usados para generar la documentación necesaria para la Validación. Deberá existir un protocolo por cada validación iniciada, el cual deberá ser aprobado previamente por el Comité de Calidad. Los Documentos generados deben cumplir los siguientes requisitos:

- Ser Concisos y Claros.

- Deberán reflejar los criterios de aceptación establecidos para cada prueba y para el conjunto de la validación.
- Definirá de manera escueta pero con suficiente detalle las pruebas a realizar para que las mismas puedan ser ejecutadas de manera correcta.
- Describirá aquellos puntos que se consideren críticos explicando el motivo y su relación con otros puntos o procesos.
- Se adaptará al sistema de gestión documental con Control de versiones y copias.
- Dispondrá de un sistema de Control de cambios y Registro de incidencias.

Existen tres tipos de validación:

- Validación prospectiva: estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en un protocolo planificado.
- Validación retrospectiva: estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que estaba previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica (datos acumulados de fabricación, ensayos y lotes).
- Validación concurrente: estudio para demostrar y establecer evidencia documentada de que un proceso hace lo que debe hacer basado en información generada durante una implementación real del proceso. Esta validación se realiza durante la producción habitual.

Todos los procesos de fabricación de Medicamentos de Terapia Celular serán susceptibles de validación, dando prioridad a aquellas etapas o puntos críticos con elevado impacto en la calidad del producto. Las pruebas a realizar, especificaciones y los criterios de aceptación se detallarán en cada uno de los Protocolos de Validación, que serán conformes a las NCF.

La validación de un proceso será para el caso más desfavorable (Worst case), es decir la validación tiene que abarcar los límites superiores e inferiores de parámetros y circunstancias que no necesariamente provocan que el producto o el proceso fallen. De esta forma, se validan todas las situaciones posibles, incluido el intervalo de condiciones a emplear. Todas las instalaciones, servicios y equipos deben haberse validados (cualificados) o verificados antes del comienzo de la validación de procesos de producción.

Para la validación de cualquier etapa del proceso productivo, se realizarán el número de repeticiones necesarias para suministrar datos suficientes para hacer una correcta evaluación del proceso. Se fabricarán 3 lotes/ repeticiones completas del proceso que cumplan los parámetros aprobados. Los lotes de validación de los procesos serán del mismo tamaño que los lotes a escala previstos, aunque puede admitirse un escalado en casos en los que la disponibilidad de material sea escasa o por otras justificaciones.

A lo largo de las distintas etapas de la Producción de Medicamentos de Terapia Celular se llevan a cabo controles de calidad y controles en proceso que permiten evaluar la calidad del producto y el proceso. Asimismo, se realiza la toma de muestras de referencia de productos. Además, existen procesos o etapas de la fabricación que pueden validarse de forma independiente con Protocolos de Validación propios, entre ellos el transporte o estabilidad de materiales biológicos.

4.2.5. Simulación del proceso aséptico: Media fill.

La prueba de simulación del proceso aséptico, también conocida como *media fill* (en inglés) consiste en la exposición de un medio de crecimiento microbiológico a superficies de contacto del producto dentro del equipo, sistemas de cierre del envase, ambientes críticos, y manipulaciones del proceso para simular estrechamente la misma exposición a la cual el producto es sometido. Las muestras de medio recogidas durante el proceso son incubadas entonces para encontrar una posible contaminación microbiana. Los resultados son interpretados para evaluar el potencial que existe de contaminación durante el proceso de producción. Los datos de monitoreo ambiental de la simulación del proceso también pueden proporcionar información útil para evaluar todo el sistema de procesamiento. En general, se debe usar un medio de crecimiento microbiológico que promueva el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y hongos. El proceso de producción debe ser exactamente simulado usando medios y condiciones que optimicen el descubrimiento de cualquier contaminación microbiológica.

Se trata de demostrar que las habitaciones, equipo y personal son capaces de fabricar un producto con muy baja tasa de contaminación. La prueba de simulación de procesos debe imitar lo más fielmente posible el proceso de fabricación de rutina e incluye todas las etapas de fabricación. Todos los requisitos de este procedimiento están descritos en la Farmacopea Europea (314) de la siguiente forma:

- La prueba de simulación debe imitar, lo más exactamente posible, el proceso de fabricación aséptica normal e incluir todas las fases críticas.
- Se deben considerar todas las posibles situaciones (normales y *Worst case*) dentro de la producción.
- Se realiza como validación inicial con 3 pruebas de simulación consecutivos satisfactorios (3 lotes completos) por operador.
- Todo el personal que participa en los procesos de producción debe participar en un proceso de simulación al menos 2 veces al año.
- El objetivo debe ser crecimiento microbiológico cero (ninguna unidad contaminada).
- Se realizará una investigación si los resultados no muestran que el proceso está bajo control. Analizar posibles causas y establecer medidas. Repetir las pruebas de simulación hasta obtener seguridad del control de proceso y confirmar efectividad de medidas tomadas.

Cada proceso de validación aséptica, se describe en su correspondiente Protocolo de Validación y los resultados se documentan en Informes de Validación.

CONCLUSION

Los medicamentos de terapias avanzadas con fines terapéuticos son complejos y nuevos, y deben ser regulados por una normativa adecuada, con el fin de preservar la salud pública. En el 2007 se publica el Reglamento 1394/2007 (305) donde se describen los requerimientos normativos existentes en terapias avanzadas para la producción de un medicamento celular. Las tareas de producción deben realizarse en salas blancas cuyo sistema de garantía de calidad esté regido por las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario (315). Las salas blancas deben ser autorizadas previamente por la AEMPS, por la Subdirección de inspección, quedando inspeccionadas las instalaciones, personal, validaciones y proceso. Siendo el resultado apto de dicha inspección, se procederá a la fabricación de un medicamento celular.

5. PRODUCCIÓN DE CELULAS STEM MESENQUIMALES PARA USO CLINICO.

Todos los requisitos gubernamentales citados anteriormente, aunque sean percibidos por los profesionales como exceso de regulación, son necesarios para equilibrar los estándares de alta calidad que garantizan la seguridad del paciente. Incluso la influencia de parámetros como la variabilidad entre donantes o la heterogeneidad intrínseca de las CSM sobre las características del producto final no pueden ser eliminados y deben ser objeto de un intenso control de calidad.

5.1. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE CSM.

El número limitado de CSM en la mayoría de tejidos requiere su expansión *ex vivo* para producir la dosis de células deseada. Se han desarrollado varios medios de cultivo para la expansión *in vitro* de CSM; la mayoría de ellos incluyen suero bovino fetal (SBF o FBS en inglés) a varias concentraciones como un suplemento que promueve el crecimiento. El SBF, sin embargo, es crítico debido al riesgo de contaminación con agentes extraños y residuos potencialmente inmunogénicos de la especie bovina en el producto final. En consecuencia, en la producción de CSM grado GMP, la autoridades requieren una justificación científica sólida de que el SBF es indispensable y, de ser así, los análisis específicos que indiquen la ausencia de virus bovinos y un riesgo aceptable en relación con la presencia de priones (agentes causantes de la encefalopatía espongiiforme transmisible) (316,317). Además de la prueba directa en busca de virus, el suero bovino debe ser tratado con procesos de inactivación viral si se utiliza para la fabricación de medicamentos de uso humano. La información detallada al respecto ha sido recientemente revisada por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (318) . Obviamente, para la producción de CSM-GMP, debe ser utilizado idealmente un medio "xenogenic-free" con ingredientes definidos y certificados. Sin embargo, el desarrollo de las composiciones químicas de los medios definidos parece estar siendo obstaculizado a la hora de preservar la complejidad funcional de las CSM:

adhesión, proliferación y el mantenimiento de las características biológicas, claves para su función terapéutica (319).

En los últimos años, se han desarrollado alternativas al uso de SBF para la expansión de CSM (320–323). El lisado de plaquetas humanas (LP) es considerado como una alternativa aceptable (324–327). El LP está fabricado a partir de concentrados de plaquetas. Por ciclos repetidos de congelación-descongelación, las plaquetas se rompen mecánicamente para liberar sus factores de crecimiento. Pueden ser utilizados tanto concentrados de plaquetas derivadas de la fracción leucocitaria como concentrados de plaquetas derivados de aféresis (320,328,329). Los concentrados de plaquetas utilizados para la producción de LP pueden ser congelados inmediatamente después de la donación o usado al final de su vida útil (de 4-6 días después de la donación, dependiendo de la regulación local actual) (329). Este último permite el uso de concentrados de plaquetas que no se utilizan para la transfusión, evitando de este modo no sólo expiración de unidades donadas sino también donaciones adicionales. Los concentrados de plaquetas que se utilizan como suplementos del cultivo celular pueden ser congelados y almacenados en cuarentena para aumentar su seguridad. Los concentrados se descongelan y se centrifugan para generar LP, con lo cual el LP de diferentes donantes puede mezclarse para reducir la variabilidad. El LP puede ser filtrado de manera estéril para aumentar seguridad microbiológica (320,328) y ser de nuevo almacenado a -20°C durante un período de tiempo prolongado, manteniendo estable su contenido en factores de crecimiento (330). Las normas GMP se deben aplicar durante todo el proceso de producción y almacenamiento del LP. El uso de suplementos humanos, tales como LP, en lugar de SBF puede suponer cambios significativos de las características de CSM. La mayoría de los estudios confirmar una proliferación acelerada de CSM en LP comparada con SBF. Es importante destacar que esto no parece estar asociado con inestabilidades cromosómicas recurrentes, que si se han observado en las CSM cultivadas con SBF (331,332).

Al analizar con Microarray se han identificado cambios de expresión génica en diferentes condiciones de cultivo. (333,334). Especialmente, la diferenciación, adhesión y migración son propiedades clínicamente relevantes de las CSM. Así, los cambios en estas funciones celulares pueden causar diferencias en su potencial terapéutico y por lo tanto deben ser cuidadosamente evaluadas cuando se cambian los suplementos de cultivo. Después de la infusión intravenosa, las CSM cultivadas con suplemento humano se detectaron en cantidades más bajas en los pulmones de ratones en comparación con CSM expandidas en SBF (335). Si este atrapamiento disminuido está relacionado con reducción de la interacción con las moléculas de la matriz extracelular, cambiado las especificidades de homing u otros efectos, es una cuestión de análisis, especialmente en vista de los riesgos de equilibrio y la eficacia del tratamiento (335,336). Una baja tasa de células atrapadas en el pulmón puede limitar el riesgo potencial de embolia pulmonar (337,338).

5.2. REQUERIMIENTOS DE CALIDAD PARA EL USO CLÍNICO DE CSM.

Como medicamentos de terapia avanzada, las CSM deben satisfacer todos los requisitos de calidad y seguridad durante el ciclo de producción, lo que garantiza su uso seguro en el paciente. El proceso de fabricación de las CSM para uso clínico debe cumplir con los principios GMP para asegurar la reproducibilidad, la eficacia, y la seguridad del producto clínico, basados en el anexo 2 de la Normativa Europea 1394/2007 (339). Esto asegura que las preparaciones celulares son elaboradas y controladas desde la obtención y manipulación del material biológico de partida hasta el procesamiento de productos intermedios, controles de calidad, almacenamiento, etiquetado y acondicionamiento, y liberación. Durante todo el proceso de producción deben ser conocidos y descritos los puntos críticos. Un minucioso análisis de riesgos en todas las fases de producción asegura el control de la calidad esperada en el producto final.

5.2.1. Aislamiento y expansión de CSM.

Todos los reactivos y materiales utilizados durante estas etapas deben ser definidos y controlados, los proveedores deben ser validados, y todos los lotes recibidos aprobados por el Departamento de Control de Calidad, sobre la base de las especificaciones y las pruebas de control de calidad. Las células y los tejidos utilizados como materia prima para producir medicamentos deben cumplir con la Directiva 2004/23/CE (309), la Directiva 2006/17/CE(310) y la Directiva 2006/86/CE(311) relativa a la donación, la obtención y manipulación de las células y tejidos humanos. En particular, el Anexo 1 de la Directiva 2006/17/CE define los criterios de selección de donantes.

El uso de reactivos GMP en los cultivos *ex vivo* está limitado ya que sólo se comercializan unos pocos como el PBS, el medio de cultivo o la tripsina. La introducción de sistemas cerrados para el aislamiento de las células mejora la generación de protocolos clínicos seguros.

Otro parámetro importante a ser considerado es la densidad de siembra, la cual es importante para la expansión de las CSM en cultivo. Recientes estudios muestran que la siembra directa de médula ósea es más ventajosa en términos de número de unidades formadoras de colonias, mínima manipulación, contaminación hematopoyética y crecimiento celular, mostrando menor contaminación hematopoyética en el primer pase con médula ósea total que con Ficoll o Percoll (336,340,341). Una siembra inicial a una densidad de entre 10.000 y 150.000 células/cm², utilizando recipientes de cultivo a gran escala, mejora significativamente el crecimiento, proporcionando gran número de células a partir de una pequeña cantidad de médula ósea (340,342).

5.2.2. Controles de Calidad para la validación de la Producción de CSM.

A lo largo de las distintas etapas de la Producción de Medicamentos de Terapia Celular se llevan a cabo controles de calidad y controles en proceso que permiten evaluar la calidad del producto y el proceso. Asimismo, se realiza la toma de muestras de referencia de productos. De acuerdo con la Farmacopea Europea (343), el proceso de control de calidad debe ser validado

para confirmar que el procedimiento analítico utilizado para una prueba específica es adecuado para su uso previsto. Los resultados del método de validación se pueden utilizar para evaluar la calidad, la fiabilidad y consistencia de los resultados analíticos (344).

5.2.2.1. IDENTIDAD.

Como se citó con anterioridad, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (345) ha propuesto tres criterios mínimos para identificar las CSM de médula ósea: la adherencia al plástico; la expresión de antígenos de superficie específicos (positividad para CD105, CD73, CD90 y negatividad para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y HLA de clase II); y la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, y condroblastos bajo condiciones estándar de cultivo *in vitro* (57). Estos criterios pueden ser también aplicados a CSM derivadas de otras fuentes, aunque su inmunofenotipo puede ser ligeramente diferente, sobre todo en las primeras fases cultivo (346). Las CSM adherentes al plástico son típicamente visibles en 5-7 días después de su siembra, al microscopio aparecen como células fibroblastoides con una forma heterogénea, incluyendo células similares a las endoteliales. Sin embargo, durante la expansión, las células adherentes se vuelven menos heterogéneas predominando las de tipo fibroblasto. El fenotipo de las CSM debe al menos mostrar la expresión positiva (> 90%) para CD105, CD73, CD90 y expresión negativa (<5%) para CD45, CD34, y CD14. La capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, y condrocitos bajo condiciones de cultivo estándar *in vitro* sigue siendo la manifestación más válida de la multipotencialidad de las CSM (57). La evidencia de la diferenciación osteogénica debe ser demostrada por la actividad fosfatasa alcalina y la tinción de depósitos de calcio (coloración Alizarin). La diferenciación adipogénica debe ser demostrada a través de la apariencia morfológica de gotitas de lípidos teñidas por la tinción con Oil Red O. La diferenciación condrogénica puede evaluarse por cultivo de agregados celulares de CSM en suspensión en un medio condrogénico comercial que flotan libremente; después de la inclusión en parafina del agregado y su posterior tinción con Azul Alcian, se puede identificar la presencia de ácido hialurónico y sialomucina. La capacidad pluripotente debe demostrarse en los tres linajes de diferenciación. El reciente artículo de Menard y Krampera (342,345) sugiere algunos ensayos inmunológicos reproducibles para cuantificar las propiedades inmunomoduladoras de las CSM producidas bajo condiciones GMP. Estos análisis se recomiendan en la fase de validación (o en preclínica), pero no son obligatorios para la liberación de CSM en las fases de producción.

5.2.2.2. CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO.

La tasa de crecimiento de expansión celular de CSM debe ser evaluada contando las células en cada pase y expresado en términos de CPD (*Cumulative Population Doublings*) utilizando la fórmula $\log N / \log 2$, donde N es el número de células obtenidas en el pase dividido por el número inicial de células sembradas (347). Por cuestiones de seguridad clínica, la expansión no debe exceder de cuatro pases en un intento de minimizar la administración de células senescentes.

5.2.2.3. ESTERILIDAD.

En la práctica, la esterilidad de un producto se define por la ausencia de microorganismos viables. Esta prueba se realiza en el producto final y es una de las pruebas de control de calidad necesarias para la liberación de un lote de producto estéril. Para el control microbiológico, la esterilidad debe ser evaluada en cada pase en una muestra representativa de los productos, conteniendo células (348). Debido al pequeño volumen de los medicamentos basados en células, el análisis se suele hacer en ocasiones en el sobrenadante (sin células).

- Bacteriología. Para el control microbiológico, las muestras se pueden analizar con un test microbiológico rápido de acuerdo con la Farmacopea Europea (EuPh 2.6.27) (349,350).
- Endotoxinas. Se suele utilizar la prueba con lisado de amebocitos de limulus (LAL). Método cuantitativo para detectar endotoxinas de bacterias Gram negativas en una solución de acuerdo con la Farmacopea Europea (EuPh 2.6.14) (351).
- Micoplasma. Cualquier contaminación por micoplasma podría ser detectada a través de la reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (qPcR). Todas las técnicas para detectar contaminación por micoplasma deben ser validadas y llevarse a cabo de acuerdo con la Farmacopea Europea actual capítulo 2.6.7 (352).

5.2.2.4. TUMORIGÉNESIS.

Aunque no se ha informado sobre la formación de tumores durante el proceso de validación en los ensayos clínicos en curso utilizando CSM (353), la tumorigénesis se debe probar durante la validación del proceso. A estos efectos, los métodos válidos para excluir la tumorigenicidad potencial son los siguientes:

- Evaluación de la actividad de la telomerasa, teniendo en cuenta que se ha documentado que las CSM humanas no malignas muestran un nivel bajo o indetectable de la actividad de la telomerasa.
- Prueba de *soft agar*, con una línea celular comercial como control positivo o con ensayos *in vivo* llevados a cabo en el estudio preclínico en animales adecuados como se informa en la Farmacopea Europea 5.2.3 (European Pharmacopoeia. (2013). 8th edition).
- Estudios *in vivo* en modelo animal con análisis histopatológico de los órganos y tejidos.
- Nivel de expresión de C-myc mediante qPcR
- Cariotipo. Para demostrar que el método de expansión mantiene la estabilidad genómica durante el período de cultivo *in vitro*, debe realizarse el análisis de cariotipo. La demostración de la ausencia de inestabilidad genética por análisis de cariotipo debería ser evaluada por técnicas de biología molecular (354) o métodos convencionales (bandas G). Deben ser analizadas al menos 20 metafases según lo definido por la Normativa General y Garantía de

INTRODUCCIÓN

Calidad para Citogenética (353,355,356). El análisis del cariotipo sería suficiente como test de liberación con la exclusión de dos metafases anormales idénticas en 20 metafases analizadas (10%) (357,358), comparando el cariotipo del lote final con el del donante o paciente.

CONTROLES DE CALIDAD	PARAMETRO
IDENTIDAD	Morfología Inmunofenotipo Potencial de diferenciación Viabilidad
CRECIMIENTO	CPD
ESTERILIDAD	Test Microbiológico Test LAL Test de Micoplasma
TUMOROGÉNESIS	Actividad telomerasa Cariotipo C-myc

Tabla 2. Resumen de Controles de calidad requeridos para la producción de las CSM.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

En los últimos años se han publicado datos esperanzadores sobre la seguridad y potencial eficacia de las CSM como medicamento de terapia celular en multitud de patologías de diferente etiología (176,359–380). Pese a que la mayoría de los datos corresponden a estudios preclínicos y ensayos clínicos fases I-II, parece justificado concluir que el tratamiento con estas células es seguro y con elevadas tasas de eficacia en subgrupos de pacientes.

Uno de los principales factores que puede estar limitando la generalización de estos buenos resultados clínicos es, en el caso de ensayos con administración intravenosa de las CSM, que son pocas las células que finalmente alcanzan el tejido diana.

Nuestra hipótesis de trabajo surge del interés por superar esta dificultad, tratando de mejorar la afinidad de las MSC por los tejidos dañados para su aplicación en clínica.

El Dr. Robert Sackstein demostró por primera vez que la afinidad de las CSM por el endotelio vascular en condiciones de alto flujo, se incrementaba significativamente mediante la fucosilación enzimática del antígeno de CD44 presente en la superficie de las CSM, lo que abría la posibilidad de mejorar el rendimiento de su infusión intravenosa y por tanto su eficacia terapéutica (381–384). En elegantes experimentos en modelos murinos logró demostrar que su tecnología denominada “Glycosyltransferase-Programmed Stereosubstitution” conseguía un incremento significativo del tráfico de las CSM humanas fucosiladas inyectadas por vía intravenosa hacia la médula ósea de los ratones inmunodeprimidos, donde eran capaces de producir osteocalcina humana (244,385,386).

La traslación de esta tecnología al paciente como medicamento a ensayar en programas clínicos de terapia celular, requiere su fabricación en una unidad de producción celular o “sala blanca” certificada, en el caso de nuestro país, por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

El Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca cuenta con una Unidad de producción celular (UPC) integrada como plataforma del Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Nuestro grupo de investigación colabora desde hace años con el Dr. Sackstein y hemos reproducido y validado sus experimentos de fucosilación en modelos animales en nuestro laboratorio (368,387,388).

Teniendo en cuenta estos antecedentes nuestra hipótesis de este trabajo, es que la fucosilación in vitro de células madre mesenquimales de médula ósea puede realizarse eficazmente a escala clínica bajo condiciones GMP adaptándose a la normativa vigente para la fabricación de medicamentos de Terapia Celular.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GLOBAL.

Validar un protocolo de expansión y fucosilación de CSM de médula ósea humanas a escala clínica siguiendo las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Poner a punto la técnica de fucosilación de CSM humanas de médula ósea expandidas *in vitro* sin SBF ni tripsina porcina y comparar su eficacia en relación al protocolo clásico de expansión y fucosilación publicado por el Dr. Sackstein.
2. Trasladar los protocolos básicos de expansión y fucosilación a escala clínica en la Unidad de Producción Celular (UPC) del HCUVA, generando toda la documentación necesaria para la producción GMP (Protocolos Normalizados de Trabajo, Guías de Fabricación de Lote, Registros, Especificaciones de materiales y producto terminado, etc.)
3. Validar el proceso aséptico realizando ensayos de simulación del proceso de producción de CSM de médula ósea humanas fucosiladas con medio enriquecido para la promoción del crecimiento bacteriano en las instalaciones de la UPC del HCUVA.
4. Validar el proceso de producción, expandiendo y fucosilando CSM de médula ósea humanas de donante sano a escala clínica en las instalaciones de la UPC del HCUVA.
5. Verificar que los tres lotes de validación cumplen las especificaciones previamente establecidas para el medicamento “Células mesenquimales troncales adultas de médula ósea expandidas y fucosiladas”.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO Y FUCOSILACIÓN DE CSM-MO CULTIVADAS SIN EMPLEO DE DERIVADOS ANIMALES.

La primera etapa experimental de este trabajo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Robert Sackstein (Dematology Department, Brigham and Women's Hospital) en Boston-USA, adaptando el método clásico usado por su grupo para el aislamiento y expansión en cultivo de células mesenquimales de médula ósea (28,244), al de producción de células para uso humano, en el que se tiende a minimizar el uso de derivados animales que puedan ser fuente potencial de transmisión de infecciones o reactividad inmune.

Para ello sustituimos suplementos de origen animal y reactivos convencionales de uso en investigación básica por otros homólogos de mayor calidad y aptos para su uso en humanos (389).

Se verificó la identidad de las células mesenquimales obtenidas y la eficacia de la técnica de fucosilación en las células cultivadas bajo estas condiciones.

1.1. OBTENCIÓN DE LISADO PLAQUETARIO.

El LP utilizado para el cultivo de las CSM en Boston, procedía de unidades de plaquetas caducadas procedentes del Brigham and Women's Hospital. El protocolo utilizado para la obtención del lisado plaquetar se resume en:

- Introducir los concentrados de plaquetas a -80°C un mínimo de 3-4 días y descongelarlos pasado este tiempo en baño a 37°C .
- Alicuotar todo el volumen de plaquetas en tubos estériles tipo Falcon y centrifugar a 900g durante 30 minutos.
- Decantar suavemente el sobrenadante de todos los tubos en un recipiente estéril haciendo un *pool*. Homogeneizar el *pool* de lisado y alicuotarlo en tubos estériles que se almacenan a -20°C listos para su uso.

1.2. AISLAMIENTO, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CSM DE MO HUMANAS SUSTITUYENDO EL SUERO BOVINO FETAL POR LISADO PLAQUETARIO Y LA TRIPSINA POR TRYPLE SELECT.

1.2.1. Obtención de muestras de MO.

Para la obtención de células mesenquimales se utilizaron los restos celulares de las bolsas de progenitores hematopoyéticos de médula ósea utilizados para el trasplante, procedentes del Massachusetts General Hospital. Una vez recibida la bolsa en el laboratorio, se inyectaban 10 ml

de DPBS (Invitrogen, Gran Island, NY USA) a través de uno de sus puertos para lavar bien la bolsa y se extraía la solución de médula ósea diluida.

1.2.2. Aislamiento de células mononucleadas.

La médula ósea diluida se sometió a un gradiente de densidad con Ficoll (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA) según el protocolo descrito por Boyüm (390) que consiste en:

- Filtrar la médula ósea diluida a través de un tamiz de Nylon de 100 μm (*Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA*).
- Verter en un tubo de centrifuga la cantidad necesaria de Ficoll teniendo en cuenta que la proporción para hacer el gradiente de densidad será 1:2 (Ficoll: médula ósea diluida).
- Añadir la medula diluida muy lentamente dejándola deslizar por las paredes del tubo para que no atravesase el menisco que forma la interfase.
- Centrifugar a 495 g durante 30 min a 15 °C sin freno. (Figura 11)
- Recoger, cuidadosamente y con pipeta Pasteur de cristal conectada a una perilla de aspiración, el anillo celular formado (células mononucleadas) sobre la solución de Ficoll y transferirlo a otro tubo estéril.

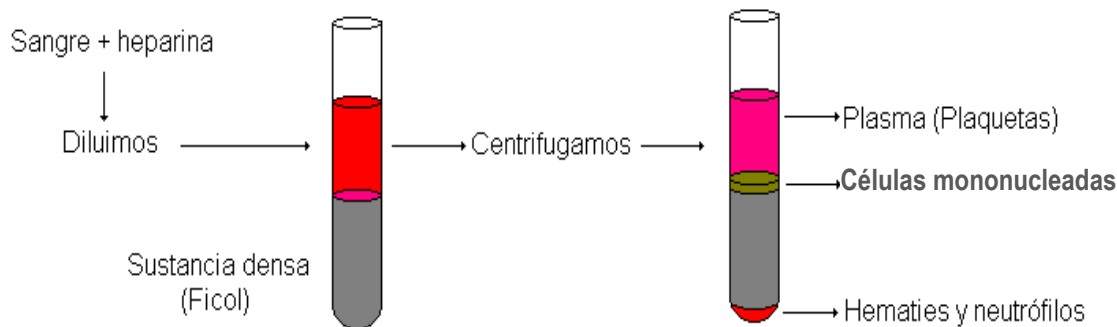


Figura 11. Esquema de obtención de la fracción mononuclear de médula ósea con gradiente de ficoll.

- Resuspender la fracción de células mononucleadas (CMN) con DPBS.
- Centrifugar (con el freno puesto) a 493 g, durante 10 min. Repetir este paso.
- Volver a retirar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en DPBS.
- Tomar una alícuota de la suspensión celular y mezclarla 1:1 con azul de tripan (Sigma-Aldrich, MO USA) para recuento de las células en una cámara hemocitométrica de Neubauer.
- La lectura de las células viables y no viables fue realizada por microscopia de luz y el cálculo del número de células/mL fue determinado por la siguiente fórmula:

$$V \times FN \times FT / \#Q$$

V= número de células viables contadas
 FN = factor de la cámara de Neubauer
 FT = factor de dilución del Azul de tripan
 #Q = número de cuadrantes de la cámara utilizados para el recuento.

La viabilidad se determinó por la técnica de exclusión vital, o sea, exclusión de las células no teñidas por el azul de tripan (391).

1.2.3. Cultivo y expansión de células madre mesenquimales.

Las células obtenidas se dividieron en dos tubos para ser cultivadas según el protocolo de cultivo del “grupo de Boston” (MEDIO 1) y el protocolo utilizado por el “grupo de Salamanca” (adaptado de Carrancio S et al 2008 (389) (MEDIO 2):

- MEDIO 1: DMEM bajo en glucosa+10% suero bovino fetal (SBF) + 1% penicilina-estreptomicina
- MEDIO 2: DMEM bajo en glucosa+5% de lisado plaquetario (LP) + 1% penicilina-estreptomicina y heparina (2U/ml).

Las células mononucleadas se sembraron en frascos de cultivo celular a razón de 160.000 células/cm², en estufa con atmósfera humidificada a 37°C y con 5% de CO₂ con cada uno de los medios. A las 24 horas de cultivo se realizó el primer cambio de medio. Se reemplazó el medio de cultivo dos veces por semana hasta que las células adherentes llegaron al 60-80% de confluencia. En este momento, se realizó en primer pase de cultivo:

- Se retiró todo el medio de cultivo del frasco y se lavó con PBS estéril (GIBCO Invitrogen Corporation, Gran Island, NY, USA).
- Para despegar las células cultivadas en Medio 1 se utilizaron incubaciones con tripsina al 0.05 % (GIBCO Invitrogen Corporation, Gran Island, NY, USA) durante 5 minutos y posterior neutralización con SBF (GIBCO, USA) y para las células cultivadas en Medio 2, se emplearon 5 minutos de incubación con Tryple Select (GIBCO, USA) sin ser necesaria su neutralización.
- Se recogieron los sobrenadantes de los frascos de cultivo en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 700 g durante 5 minutos.
- Se retiró el sobrenadante decantando y se resuspendió el *pellet* celular con medio de cultivo.
- Se realizó un recuento en cámara de Neubauer según se ha descrito anteriormente y se sembraron de nuevo las células a razón de 1000 cél/cm².
- Tras el tercer pase se obtuvieron células con morfología y fenotipo compatible con el de células stem mesenquimales de médula ósea (CSM-MO) que se emplearon para los estudios que se describen a continuación.

1.3. FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANAS.

Una vez despegadas y contadas las CSM-MO, se llevaron 5 millones de células de cada condición a una concentración de 30×10^6 cél/ml en buffer de reacción que contenía HBSS (GIBCO Invitrogen, Gran Island, NY, USA), 0.1% (w / v) de albúmina de suero humano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA), GDP-fucosa (Sigma-Aldrich, USA) y tampón HEPES (GIBCO, Invitrogen, USA) a un pH final de 7,0-7,2. Cada muestra (cultivada con MEDIO 1 o MEDIO 2) se dividió a su vez en dos tubos, uno para control que contenía las células con el buffer y al otro se le añadió además la enzima FTVI a una concentración de 60 mU/ml.

Se incubaron las células a 37 °C durante 1 h agitando suavemente cada 15 minutos para asegurar que todas las superficies celulares quedaban expuestas al enzima. Pasado este tiempo se centrifugaron y lavaron con DPBS. Tras el lavado se tomaron muestras para verificar la eficacia de la técnica a nivel estructural y funcional.

1.4. VERIFICACIÓN DE LA FUCOSILACIÓN: ESTUDIO COMPARATIVO.

1.4.1. Cultivo de líneas celulares control.

Las líneas celulares hematopoyéticas utilizadas como controles en la exofucosilación (KG1a y RPMI8402) fueron expandidas en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen, USA).

1.4.2. Análisis inmunofenotípico (verificación por citometría de flujo).

Tras la exofucosilación, se tomaron alícuotas de 2×10^5 células que se lavaron con PBS al 2% de SBF y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario o secundario conjugado con el fluorocromo FITC (en el caso del control isotópico) como muestra la siguiente tabla. Tras una hora de incubación se volvieron a lavar las células 2 veces con el mismo buffer y se añadió un segundo anticuerpo conjugado con FITC a las muestras que habían sido incubadas con el anticuerpo primario. La incubación se realizó durante 1 hora en oscuridad. Tras volver a lavar las células, se determinó la intensidad de fluorescencia para FITC usando el citómetro de flujo Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter, USA).

ESTRUCTURA DETECTADA	ANTICUERPO 1º		ANTICUERPO 2º	
	CLON	ORIGEN	CLON	ORIGEN
sLe ^x	IgM anti-human CLA (HECA452, PharMingen)	Rata	FITC-anti rat IgM (Southern Biotech, USA)	Cabra

Tabla 3. Anticuerpos usados para la detección por citometría de flujo de HCELL.

1.4.3. Análisis molecular: electroforesis en gel de poliacrilamida y Western Blot.

1.4.3.1. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA.

Las CSM no tratadas y tratadas con fucosiltransferasa VI (FTVI), cultivadas bajo las dos condiciones a estudio junto con las líneas celulares control (RPMI8402 y KG1a), fueron lisadas usando 2% de NP40 en buffer de lisis (150 mM de NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 20 µg/ml de PMSF, 0.02 % NaN₃) y Cocktail Inhibidor de Proteasas (Roche Molecular Biochemicals), manteniendo las muestras en rotación durante 12 horas a 4°C. Las células lisadas se centrifugaron a 3600 g durante 5 minutos y se colectaron los sobrenadantes. La concentración de proteína se determinó usando el método BCA (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, USA)(385).

1.4.3.2. SDS-PAGE.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) es la técnica analítica empleada para separar proteínas. SDS-PAGE permite separar las proteínas concretamente en función de su peso molecular. En este caso se realizó utilizando geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil-sulfato sódico (SDS), utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemli. Como geles separadores se emplearon geles con un gradiente lineal de poliacrilamida del 4 al 20% en tampón Tris-HCl y pH 8.8 (*Criterion Precast Gel*, Biorad, CA, USA). Para la preparación de la muestra se utilizaron 45 µg de proteína a una concentración final de 3 µg/µL en buffer de lisis, a los que se añadió tampón de carga (*Reducing Sample Buffer 4X*, Boston Bioprod, USA) para favorecer la solubilización de las proteínas. Tras una incubación de 7 minutos a 100°C, la mezcla se centrifugó a velocidad máxima y se procedió a su carga en el gel con 40 µL de muestra. Se utilizó el marcador de alto peso molecular *Precision Plus Protein All Blue Standard* (BioRad, CA USA). La electroforesis se realizó en un sistema *Mini-Protean®3 Cell* (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora (237).

1.4.3.3. ELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS: WESTERN BLOT.

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE se electrotransferieron a membranas de PVDF con un tamaño de poro de 0.45 µm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) mediante el sistema de electrotransferencia *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, USA) tal y como indica el fabricante. Se cortaron dos piezas de papel Whatman y una membrana de PVDF, cada una de ellas del mismo tamaño que el gel a transferir. El papel *Whatman* y las almohadillas de fibra se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% (v/v) de metanol, pH 9.2) durante al menos 15 minutos. La membrana de PVDF se activó sumergiéndola en metanol 15 segundos, 2 minutos en agua destilada y al menos 10 minutos en tampón de transferencia. Los diferentes componentes se colocaron a modo de "sandwich" en el siguiente orden: una almohadilla de fibra, una lámina de papel *Whatman*, el gel de poliacrilamida y otra almohadilla de fibra. La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó aplicando una corriente constante de 390 mA durante 90 minutos.

1.4.3.4. INMUNODETECCIÓN.

Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó utilizando TBS con 5% de leche libre de grasa en agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con TBS al 0.1% de Tween20 (TTBS). Tras el lavado, la presencia de estructuras proteicas o marcadores de membrana se reveló con anticuerpos específicos de la proteína de interés, como muestra la tabla 3. Las incubaciones con el anticuerpo primario se realizaron en TTBS durante una hora en agitación y a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se lavaron las membranas 3 veces con TTBS durante 5 minutos cada lavado. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario combinado con Peroxidasa de rábano (HRP) durante otra hora en agitación y a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas varias veces con TTBS y realizar un último lavado con TTBS, se incubaron con el reactivo sustrato de la peroxidasa Western Blue (Promega, Madison, WI). En el caso de la incubación con la quimera de E-selectina, las soluciones han sido suplementadas con 2mM CaCl₂, ya que la unión a E-Selectina es dependiente de Calcio. SACK-1 es un anticuerpo monoclonal generado contra la molécula HCELL de la línea celular mieloide KG1a por el Dr. Sackstein que reacciona específicamente con los glicanos α 2,3-sializados de CD44 (237,385,392).

ESTRUCTURA DETECTADA	ANTICUERPO 1º			ANTICUERPO 2º		
	CLON	ORIGEN	DILUCIÓN	CLON	ORIGEN	DILUCIÓN
sLe ^x	Anti-human/mouse IgM CLA (HECA452, PharMingen)	Rata	0,5 µg/ml	Anti rat IgM - HRP- (Southern Biotech, USA)	Cabra	1/5000
α 2,3-sialil-CD44	SACK-1	Ratón	1/10000	Anti mouse IgG-HRP (Southern Biotech, USA)	Cabra	1/5000
Ligando E-selectina	Recombinant mouse E-selectin/human Fc chimera (R&D Systems)	Rata	1 µg/ml	Anti-human IgG	Cabra	1/2000

Tabla 4. Anticuerpos usados para verificación de la exofucosilación por Western-Blot.

1.4.4. Análisis funcional: “Stamper Woodruff Assay”.

Para llevar a cabo el ensayo se preparó una suspensión de 10x10⁶ linfocitos/ml en medio de cultivo RPMI1640 (Invitrogen, USA) aislados de sangre periférica mediante gradiente de densidad por centrifugación con Ficoll como se ha explicado anteriormente. La suspensión se mantuvo en hielo hasta el momento de ser usada.

Tras la fucosilación, se tomó una muestra de CSM de cada condición de cultivo (MEDIO 1 y MEDIO 2). Las células se depositaron en una región determinada de un portaobjetos de cristal mediante citocentrifugación (Cytospin3, Shandon, USA). Tras sacar los portas de la centrífuga se fijaron con glutaraldehido al 3% (Sigma Aldrich, USA) durante 10 minutos y se aclararon con

DPBS. A continuación se incubaron con una solución de Lisina 0,2 M durante 10 minutos y volvieron a lavar con DPBS. Las preparaciones se conservaron en medio RPMI al 2% de FBS a 4°C hasta el momento de ser utilizadas.

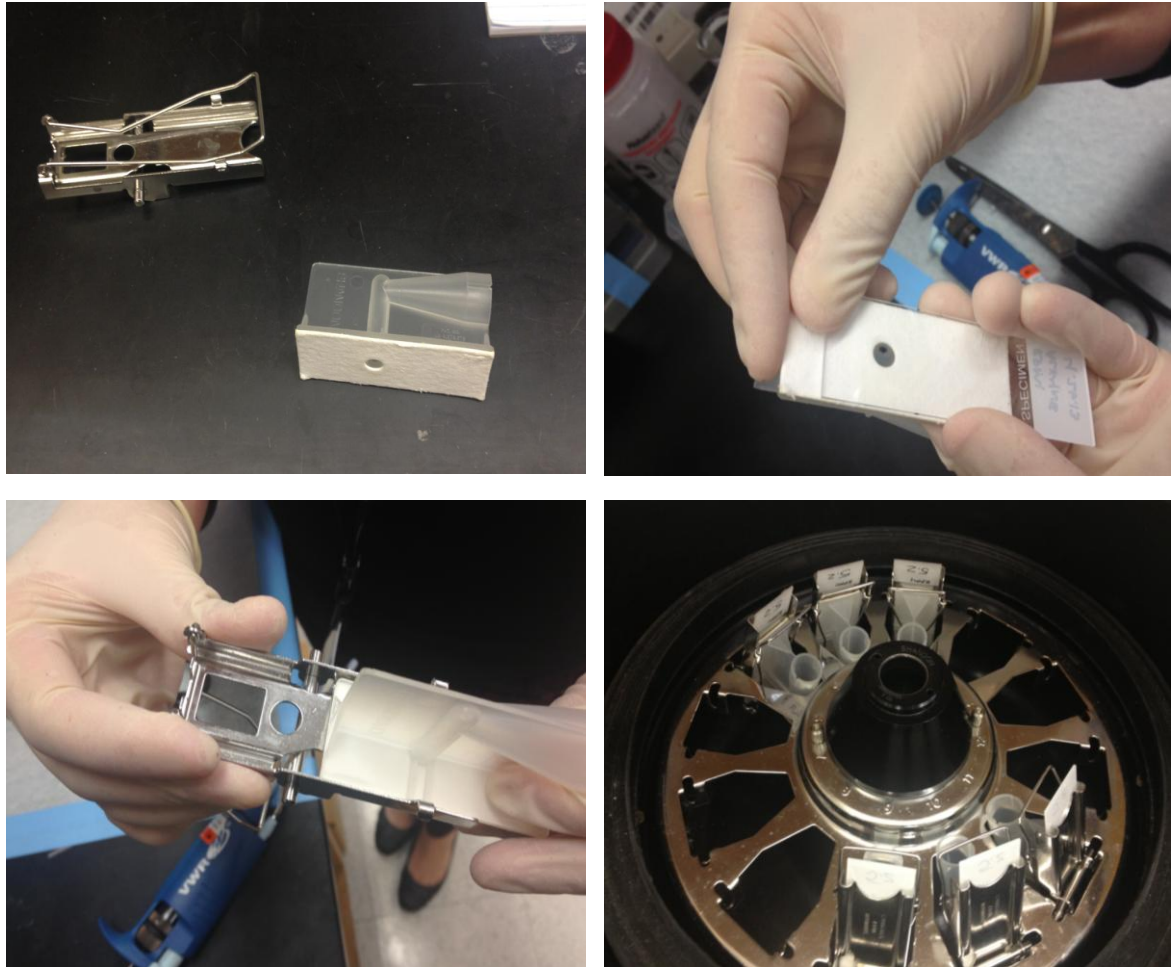


Figura 12. Procesamiento de las extensiones de CSM por Cytospin.

Una vez que estuvieron listos los linfocitos y las preparaciones de cristal con las células (tanto CSM como la línea celular RPMI8402), se colocaron los cristales sobre una plataforma en rotación a 80 rpm y 4°C. Se dejó caer gota a gota la suspensión de linfocitos con pipeta Pasteur hasta cubrir las células fijadas al portaobjetos en agitación y se incubó en estas condiciones durante 30 minutos.

Posteriormente se lavaron las preparaciones con PBS para eliminar los linfocitos no adheridos. La adherencia de los linfocitos a las células fue observada utilizando un microscopio invertido de contraste de fases.

Tras la adaptación del protocolo básico de fucosilación se llevó a cabo un estudio preclínico de seguridad y eficacia que consistió en la infusión de CSM-MO fucosiladas humanas a ratones NOD/SCID. Este estudio ha dado lugar a la Tesis Doctoral "Trasplante de Células madre fucosiladas".

siladas en el tratamiento de la Osteoporosis. Estudio preclínico y prueba de concepto” del Dr. Valentín Cabañas (393).



Figura 13. Incubación de CSM con solución de linfocitos de sangre periférica.

Tras el duro trabajo realizado, nos encontramos con el contratiempo de una pérdida de stock de la enzima FTVI con la que habíamos realizado todos los experimentos. En colaboración con Dr. Sackstein realizamos numerosos ensayos con FTVII y reportamos a la Agencia Española del Medicamento datos que avalaban la idoneidad de la FTVII para ser utilizada en sustitución de FTVI (Anexo I del presente trabajo).

2. DOCUMENTACION.

Los protocolos de cultivo y fucosilación de mesenquimales de médula ósea validados hasta el momento en el laboratorio de investigación básica, fueron la base para elaborar la documentación necesaria para su inclusión dentro del sistema de gestión de la calidad de la Unidad de producción celular. Para ello adaptamos dichos protocolos a lo que dicta la Guía de NCF (394) en cuyo Capítulo 4: Documentación (revisado en enero de 2011), se hace énfasis en que una buena documentación constituye una parte fundamental del sistema de Garantía de Calidad y es clave para trabajar cumpliendo los requerimientos de las NCF. Los diferentes tipos de documentos y medios usados deben definirse completamente dentro del Sistema de Gestión de Calidad del fabricante. La documentación puede existir en diferentes formas, incluyendo soporte en papel, electrónico o medios fotográficos. El objetivo principal del sistema de documentación utilizado tiene que ser establecer, controlar, monitorizar y registrar todas las actividades con impacto directo o indirecto en cualquiera de los aspectos de la calidad de los medicamentos. El Sistema de Gestión de Calidad debe incluir suficientes instrucciones detalladas para facilitar un entendimiento común de los requerimientos, además de proporcionar suficientes registros de los distintos procesos y una evaluación de cualquier observación, para que la aplicación continua

de requerimientos pueda demostrarse. Existen dos tipos principales de documentación usados para gestionar y registrar el cumplimiento de NCF: instrucciones (indicaciones, requerimientos) y los registros/ informes. De acuerdo con el tipo de documento se deben aplicar las buenas prácticas de documentación adecuadas.

En nuestro caso, decidimos desarrollar un sistema con soporte en papel formado por una relación jerárquica de documentos cuya codificación refleja el tipo de documento, departamento al que afecta, número de documento y versión. Ejemplo:

PNT-P-002.01

PNT: procedimiento normalizado de trabajo

P: departamento de producción

002: protocolo número dos

01: versión 01

La documentación elaborada en relación con el proceso de fabricación del medicamento y las validaciones tanto del proceso productivo como del proceso aséptico incluyó los documentos indicados en las NCF:

- Especificaciones: describen de forma detallada los requisitos que tienen que cumplir los productos o materiales utilizados u obtenidos durante la fabricación. Sirven como base de la evaluación de la calidad.
- Fórmula Patrón: proporciona todos los detalles de los materiales de partida, equipos y sistemas que tienen que usarse y especifican todas las instrucciones de procesado, acondicionamiento, muestreo y análisis. Los controles en proceso y las tecnologías analíticas de proceso a emplearse deberán especificarse cuando sean relevantes, junto con los criterios de aceptación.
- Procedimientos: (también llamados Procedimientos Normalizados de Trabajo o PNT, del inglés, Standard Operating Procedures, SOP), proporcionan indicaciones para realizar ciertas operaciones.
- Registros y Guías de Fabricación: proporcionan evidencia sobre diversas acciones que se toman para demostrar el cumplimiento con las instrucciones, por ejemplo, actividades, eventos, investigaciones, y en el caso de la fabricación de lotes la historia para cada lote de producto, incluyendo su distribución. Los registros incluyen los datos primarios que se usan para generar otros registros.
- Certificados de análisis: Proporcionan un resumen de los resultados de los análisis de muestras de productos o materiales junto con la evaluación del cumplimiento de una de-

terminada especificación. Informes: documentan la realización de operaciones, proyectos o investigaciones concretas, junto con sus resultados, conclusiones y recomendaciones.(394).

3. SIMULACIÓN DEL PROCESO ASÉPTICO MEDIA FILL.

El objetivo de esta validación era demostrar la capacidad del sistema de producción de la UPC del HCUVA para mantener la esterilidad durante los procesos de fabricación del medicamento utilizando un medio de cultivo nutritivo en lugar de las materias primas y productos habituales.

Todos los materiales utilizados en el proceso de validación/simulación disponían de certificados de análisis, procedían de proveedores homologados y habían sido aprobados por el Dpto. de Control de Calidad. Las materias primas, material biológico, reactivos y producto se sustituyeron por el medio nutritivo BHI (Brain Heart Infusion Agar). El resto de materiales fueron aquellos necesarios para reproducir el proceso de producción que se pretendía simular. El medio BHI empleado para la simulación de los procesos de producción en sustitución de la materia prima se sometió, antes y después de la simulación, a un test de promoción del crecimiento (o test de idoneidad) utilizando las cepas recomendadas por la farmacopea (349), para garantizar la ausencia de falsos negativos. Dicho medio se manipuló y expuso a operadores, equipos y superficies en las mismas condiciones que los productos biológicos.

La simulación del proceso imitó lo más exactamente posible, el proceso de fabricación aséptica normal descrito en la Formula Patrón correspondiente, prestando especial atención a las fases más críticas de la fabricación, así como a las peores situaciones posibles.

3.1. ENSAYOS Y CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

La validación inicial del proceso se repitió 3 veces por operario y en días distintos. En esta validación participó todo el personal implicado en el proceso de producción.

- Los tiempos definidos en la producción habitual (centrifugaciones, incubaciones), no se consideran críticos para la esterilidad por lo que no es necesario reproducirlos en esta validación (se utilizarán tiempos cortos).
- El proceso se reproducirá a escala menor a la original (ej.: empleando volúmenes inferiores).
- En la validación, al menos se requiere una entrada y salida de personal con cambios de vestimenta.
- Cada operario debe realizarse un control mediante impronta de guantes una vez finalizado su trabajo.

- Durante los procesos o subetapas de simulación, se realizan los controles ambientales rutinarios, en personal, equipos y ambientales.
- La identificación del lote de validación para el media fill se realizará con un código en la guía de fabricación compuesto por las iniciales CSM-MO-MF (células mononucleadas médula ósea- media fill) seguido del número de validación que corresponda, el año y las iniciales de la persona que lo realice. Ésta numeración será correlativa en el tiempo. Ejemplo:

CSM-MO-MF1/14-CAA

- La identificación de las diferentes etapas del proceso: el proceso se divide en diferentes etapas identificadas con las siguientes iniciales después del lote:
 - Etapa CP: Simulación del cultivo primario.
 - Etapa CM/PA: Simulación del cambio de medio y pase celular.
- Dado que se dispone de tres tipos de recipientes de cultivo (frascos de cultivo T175, factorías de 2 pisos y factorías de 4 pisos), cada operador, realizará una simulación con cada uno de ellos.
- Realizar impronta de guantes al final del proceso.

3.2. TEST DE IDONEIDAD DEL MEDIO EMPLEADO EN EL MEDIA FILL.

La promoción del crecimiento de las cepas recomendadas según Farmacopea 2.6.1 en presencia de BHI tiene como objetivo determinar que dicha solución permite el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, aún cuando se encuentran en bajas concentraciones (1-100 unidades formadoras de colonias) y después de haber pasado dicho medio por todo el sistema de producción. Las cepas recomendadas por Farmacopea son las siguientes (349):

Bacterias aerobias

- *Staphylococcus aureus* (ATCC6538)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027)
- *Bacillus subtilis* (ATCC6633)

– Bacterias anaerobias

- *Clostridium sporogenes* (ATCC19404)

– Hongos:

- *Candida albicans* (ATCC10231)
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC16404)

3.2.1. Reconstitución de las cepas.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron seis viales del Kit BioBall MultiShot 550 (Biomérieux, Australia). Cada uno de ellos contenía una bola liofilizada de 550 CFU de cada una de las cepas anteriormente citadas que fueron reconstituidas con el líquido de hidratación BioBall 14 Day Re-Hydration Fluid de la misma casa.

3.2.2. Inoculación de los tubos de BHI.

En la cabina de flujo laminar se inocularon 6 tubos de BHI sin utilizar (PRE) y otros 6 tubos de BHI del mismo lote procedentes de una simulación del proceso (POST) con 100 µl de cada una de las cepas microbianas reconstituidas. Una vez inoculadas las cepas, se incubaron los tubos 14 días en las estufas situadas en Control de Calidad. La lectura de las muestras se realizó cada día pudiendo observar la aparición del crecimiento microbiano por turbidez.

4. VALIDACIÓN PROSPECTIVA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN.

La validación del proceso de fabricación del medicamento en investigación “Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas” (a partir de ahora CSM-MOFUC) en la UPC del HCUVA se llevó a cabo de forma prospectiva para lo cual se elaboró previamente un protocolo planificado teniendo en cuenta las siguientes premisas:

- Las pruebas a realizar, especificaciones y los criterios de aceptación se detallarán en el Protocolo de Validación, que será conforme a las NCF.
- La validación de un proceso será para el caso más desfavorable (Worst case), es decir la validación tiene que abarcar los límites superiores e inferiores de parámetros y circunstancias que no necesariamente provocan que el producto o el proceso fallen. De esta forma, se validan todas las situaciones posibles, incluido el intervalo de condiciones a emplear.
- Todas las instalaciones, servicios y equipos deben haberse validados (cualificados) o verificados antes del comienzo de la validación de procesos de producción.
- Para la validación de cualquier etapa del proceso productivo, se realizarán el número de repeticiones necesarias para suministrar datos suficientes para hacer una correcta evaluación del proceso. Se fabricarán 3 lotes/ repeticiones completas del proceso que cumplan los parámetros aprobados. Los lotes de validación de los procesos serán del mismo tamaño que los lotes a escala previstos, aunque puede admitirse un escalado en casos en los que la disponibilidad de material sea escasa o por otras justificaciones.

Para elaborar el protocolo de validación se tuvieron en cuenta los controles de calidad planteados en cada etapa (Figura 14) y las especificaciones de cada etapa y/o producto de la Fabricación que se exponen en la tabla 5.

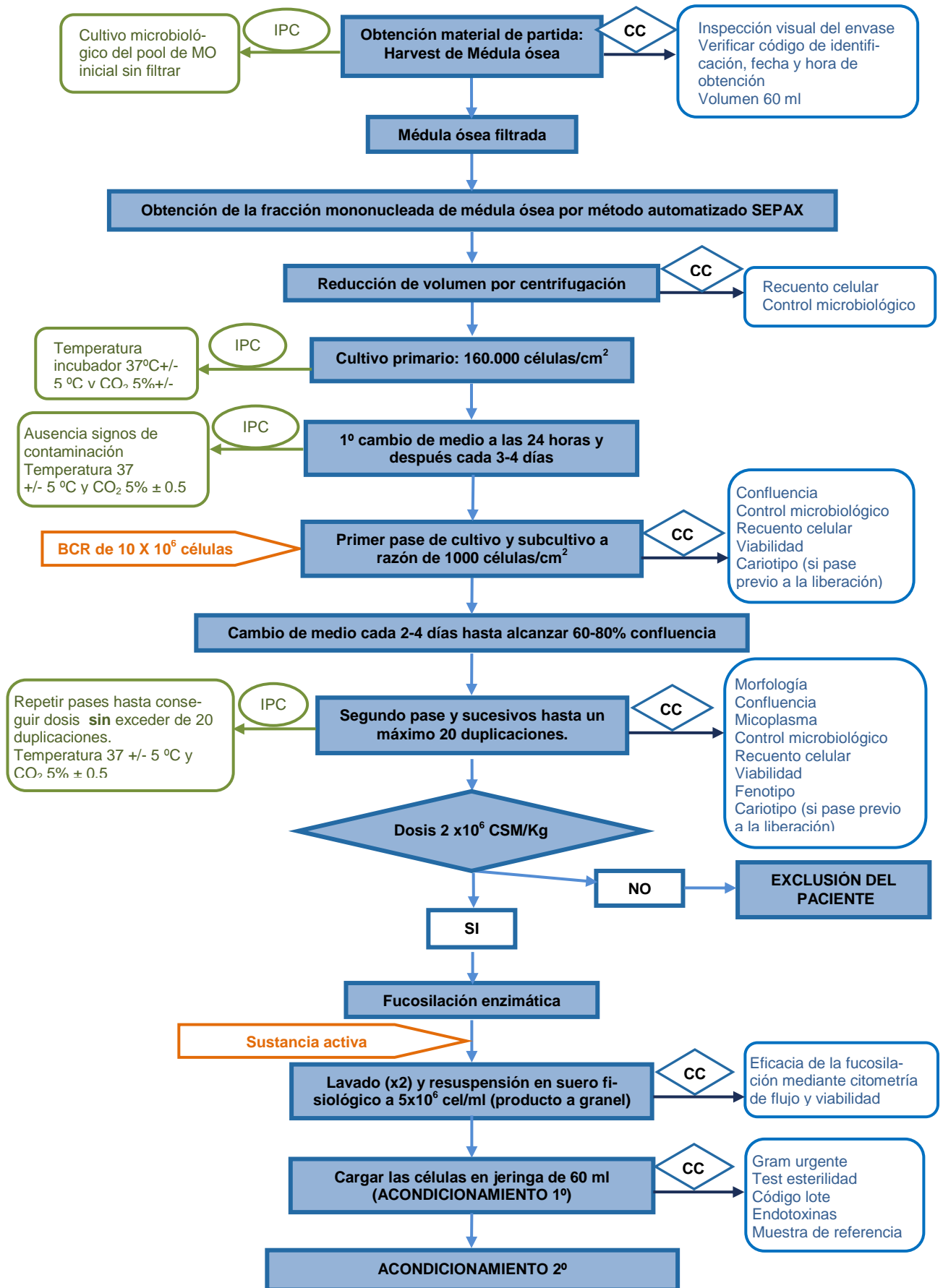


Figura 14. Flujo de fabricación del medicamento CSM-MOFUC.

	ESPECIFICACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	METODO
Material biológico de partida	Volumen de MOI	60 ml	Visual
	Serología	Negativa	Antígeno-anticuerpo
	Apariencia	Ausencia de coágulos	Visual
	Envase	Integro y sellado	Visual
	Etiquetado	Completo y correcto	Visual
Producto final	Codificación	Correcta	Visual
	Embalaje	Jeringa de 60 ml	Visual
	Dosis Celular	2 millones por kg de peso	Recuento celular y viabilidad
	Morfología	Fusiforme compatible con células mesenquimales	Registro fotográfico (previo a fucosilación)
	Fenotipo	95% Positividad para marcadores (CD105, CD73, CD90) y ausencia de marcadores hematopoyéticos	Citometría de flujo pré y post fucosilación
	Fucosilación	≥80% HCELL+ (HECA452+)	Citometría de flujo
	Viabilidad	≥70%	Azul de Trypan
	Test de Gram	Negativo	Tinción de Gram
	Micoplasma	Negativo	PcR
	Endotoxinas	≤ 0.5 EU/ml	Colorimetría
	Cariotipo	Normal	Método de bandas G
	Esterilidad	Ausencia de crecimiento	Bact-Alert
Etiquetado y envasado	Completo y correcto	Visual	

Tabla 5. Especificaciones del medicamento Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas (CSM-MOFUC).

5. CONTROLES DE CALIDAD DEL MEDICAMENTO DURANTE EL PROCESO DE FABRICACIÓN.

5.1. ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

Morfológicamente, las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología alargada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo oblongo, central, que contiene de dos a tres nucléolos (28). Se realizó un registro fotográfico de las células en cada pase hasta el último, previo a la fucosilación.

5.2. CONTROLES MICROBIOLÓGICOS.

5.2.1. Detección de *Mycoplasma*.

El test seleccionado para llevar a cabo este control fue el de amplificación de ácidos nucleicos de *Mycoplasma sp.* (352). El objetivo de este análisis fue la detección directa de micoplasmas contaminantes en el sobrenadante de cultivo de las CSM. La detección de *Mycoplasma* se basó en la visualización de los amplicones tras la realización de la amplificación del control interno y de la región codificante del ARNr 16S mediante una PcR. Los amplicones se visualizaron con una electroforesis en gel de agarosa.

5.2.1.1. MATERIALES Y EQUIPOS

- Kit Venor®GeM OneStep (Minerva Biolabs, Berlin, Alemania)
- Agua destilada estéril
- Buffer de carga 6x (Sigma Aldrich)
- Agarosa bajo punto de fusión (agarose D1 Low EEO)
- Marcador peso molecular 100-1500 pb (Invitrogen)
- SYBR® safe DNA gen stain
- TBE x10 (BioRad)
- Termobloque (Eppendorf)
- Microcentrífuga
- Termociclador (AB, Applied Biosystems)
- Cubetas y fuentes de electroforesis (BioRad, USA)
- Transiluminador UV U: Genius (Syngene, USA)
- Balanza de precisión (Cubis)
- Eppendorf 1,5 ml estériles (Eppendorf, Deltalab, Barcelona, España)
- Tubos para PCR de pared fina de 0,2 ml

- Vortex
- Micropipetas (P2,5-1000ul) y puntas específicas
- Guantes sin talco
- Material de vidrio (matraces y probetas)

5.2.1.2. DESARROLLO

Extracción del DNA

- Transferir 100 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf
- Incubar a 95°C durante 5 minutos
- Centrifugar 5 segundos a 13.000 rpm
- Utilizar 2 µl directamente para la Pcr

Preparación de los reactivos

- Hacer un spin a máxima velocidad de los reactivos liofilizados (tapón rojo y verde)
- OneStep Mix (tapón rojo): añadir 600 µl del buffer de rehidratación (tapón azul)
- Positive Control (tapón verde): añadir 300 µl de 10mM Tris Buffer (tapón blanco)
- Incubar los dos reactivos 5 minutos a temperatura ambiente
- Vortear brevemente y hacer un spin de 5 segundos
- Alicuotar la Mix en tubitos (23 µl) y almacenar a -20°C

Preparación de la Master Mix

- Atemperar los tubos preparados con 23 µl de OneStep Mix
- Añadir 2 µl de 10mM Tris Buffer (tapón blanco)
- Añadir 2 µl de CP (tapón verde)
- Añadir 2 µl del sobrenadante muestra
- Hacer un spin.

Realización de Pcr

5.2.2. Controles microbiológicos/Test de esterilidad mediante sistema BacT-Alert

El sistema consta de dos frascos con medio de cultivo claramente diferenciados:

- Verde (Aeróbicos): Permite el crecimiento de bacterias aeróbicas, microaerófilos, bacterias fastidiosas, levaduras comunes.
- Naranja (Anaeróbicos): Permite el crecimiento de bacterias anaeróbicas.

Ambos medios contienen 30 ml de medio suplementados con un complejo de aminoácidos y carbohidratos diseñados para asegurarse una producción óptima de CO₂ durante el creci-

miento bacteriano. Poseen un sensor de CO₂ que se encuentra en el fondo de la botella separado del medio por una membrana semipermeable. El sensor está impregnado con vapor de agua que se adquiere cuando las botellas son autoclavadas durante el proceso de manufacturación. La membrana tiene la característica de ser impermeable a iones hidrogenados, a componentes del medio e incluso a los componentes de la sangre, siendo permeable para el CO₂. El CO₂ producido por los microorganismos difunde a través de la membrana hacia el sensor y se disuelve en el agua, produciendo iones de hidrógeno de acuerdo con la siguiente reacción:



Los iones de hidrógeno interactúan con el sensor que es de color azul o verde oscuro debido a su estado alcalino. El CO₂ producido y disuelto en el agua incrementa los iones de hidrógeno produciendo una bajada del pH provocando que el sensor cambie a color verde claro o amarillo. El cambio de color permite que cuando incide la luz sobre el fondo de la botella haya un aumento de la luz roja reflejada en el sensor.

5.2.2.2. PROCESAMIENTO.

- Quitar el primer tapón a los frascos y descontaminar el tapón de goma con alcohol al 70%
- Pinchar en el tapón de goma con la aguja de 21G y jeringa de 1 ml, sujetando el émbolo de la jeringuilla e inoculando 200 µl en cada frasco empezando por el frasco de anaerobios.
- Rellenar el volante de microbiología con el código de Paciente, Nº de lote y tipo de muestra.
- Retirar el código de los frascos y pegarlo en el apartado Hemocultivos-código de barras (aerobio y anaerobio) del volante de microbiología. Al mismo tiempo registrar en los registros asociados a este PNT el código de lote, el código de barras y la fecha de recogida de la muestra.
- Trasladar los frascos de inmediatamente junto con el volante al Servicio de microbiología donde son procesados, incubándose 7 días a 35-37°C.

Si el sistema Bact/ALERT detecta crecimiento bacteriano, el Servicio de Microbiología realiza los pasos convenientes para la identificación del microorganismo.

5.2.3. Test de Gram urgente.

Este procedimiento se llevó a cabo por el personal del Servicio de Microbiología del HCUVA. Es un método que nos va a permitir distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram Negativas utilizando dos tipos de colorantes con capacidades diferentes: Cristal violeta y Safranina. El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram posi-

vas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El cristal violeta en presencia de Lugol forma un complejo que permite la fijación del cristal de violeta con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. Posteriormente se procede a la decoloración con una mezcla de alcohol-acetona. En este paso las bacterias Gram positivas no se decoloran, mientras que las Gram negativas sí lo hacen. Una vez decoloradas se utiliza la safranina para realizar el contraste: las bacterias Gram negativas aparecerán de color rojo, mientras que las Gram positivas permanecen violetas.

5.2.3.1. PROCESAMIENTO.

Alicuotar 50 µl de la muestra a estudio en un criotubo estéril debidamente etiquetado y entregar al Departamento de Calidad. En campana de flujo laminar:

- Identificar adecuadamente (Código paciente/ Nº de lote) un porta en la parte esmerilada con lápiz.
- Realizar una extensión de los 50 µl con un asa de siembra, formando círculos consiguiendo una extensión uniforme y clara.
- Dejar secar la extensión al menos 5 minutos bajo el flujo laminar e introducirla en una duquesita estéril, evitando así posibles contaminaciones durante el transporte. Rellenar el volante de microbiología con el código de paciente, Nº de Lote y tipo de muestra. Al mismo tiempo registrar en los registros asociados a este PNT el código de lote, el código de barras y la fecha de recogida de la muestra.

Una vez finalizado el ensayo, el Servicio de Microbiología realiza un informe con los resultados que serán controlados y registrados por el Dpto. Control de Calidad.

5.2.4. Nivel de endotoxinas.

El principal objetivo de este análisis era determinar el nivel de endotoxinas con el equipo Endosafe® -PTS™ mediante método colorimétrico cinético según Farmacopea Europea 2.6.14 (Volumen 8). Este procedimiento se lleva a cabo por el personal del Área de Control de Calidad de la UPC del HCUVA, siguiendo los requisitos descritos en las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF/ GMP).

5.2.4.1. MATERIALES.

- Endosafe-PTS (Portable Test System)
- Cartuchos desechables ENDOSAFE® - PTS
- Agua exenta de endotoxinas (apirógena)
- Puntas de pipeta exentas de endotoxina de 2-200 µl y 100-1000 µl
- Tubos con tapón de rosca exentos de endotoxina
- Pipetas automáticas P200 y P1000

- Ordenador con puerto USB e impresora.

5.2.4.2. DESARROLLO.

- Atemperar tanto la muestra como los reactivos antes de comenzar el análisis.
- Diluir la muestra 1/100 con agua apirógena.
- Conectar el equipo pulsando la tecla “Menu” y esperar a que finalice el sistema de auto-chequeo (System Self Check) y a que se alcance la temperatura óptima del ensayo (37°C). Tener en cuenta que este proceso puede durar aproximadamente 5 minutos. Una vez alcanzada la temperatura la pantalla del lector mostrará el mensaje “Insert Cartridge”. Insertar el cartucho en la ranura inferior del equipo con los pocillos hacia arriba, teniendo especial precaución de no tocar ni los pocillos ni el cuerpo del cartucho, ya que podría producir interferencias en el ensayo.



Figura 15. Imagen de los cartuchos utilizados para medición de nivel de endotoxinas.

- Introducir a continuación la información de la muestra:
 - Enter OID: Identificación del usuario mediante las iniciales.
 - Enter Lot #: Introducir el lote del cartucho (ver bolsa del cartucho y certificado de análisis)
 - Enter calibration code: Introducir el código de calibración del cartucho que figura en el certificado de análisis.
 - Enter sample Lot #: Introducir el número de lote de la muestra.

- Enter sample ID: Permite introducir datos adicionales para la identificación de la muestra.
- Enter dilution factor: introducir el valor del denominador del factor de dilución, en nuestro caso que la dilución es 1/100 debemos introducir el valor “100”.



Figura 16. Inoculación de los cartuchos ENDOSAFE con la muestra a estudio.

Una vez introducidos estos datos el equipo muestra el mensaje “ADD SAMPLE”. Vortear el tubo con la muestra diluida para homogeneizar su contenido e inocular 25 μ L de muestra en cada uno de los 4 pocillos. Presionar “ENTER” para iniciar el ensayo.

5.3. RECUENTO Y VIABILIDAD.

5.3.1. Materiales y equipos.

- Haemato Coulter (Beckman, Estados Unidos)
- Pipeteador automático (Hirschmann, Alemania)
- Cabina de Seguridad Biológica de tipo II clase A (Esco, Singapur)
- TC20™ Automated Cell Counter (Biorad, Estados Unidos)
- Pipeta 1 serológica de 1 ml
- Eppendorf de 1,5 ml
- Eppendorf de 0,5ml
- Porta para recuento celular Biorad
- Cámara de Neubauer (Biorad)
- DPBS (Gibco)
- Azul de Tripán (Sigma Aldrich, Estados Unidos).
- Petición controles citométricos

5.3.2. Desarrollo.

5.3.2.1. RECUESTO EN “HAEMATO COULTER”.

Este procedimiento se llevó a cabo para cada una de las muestras en las que se necesitaba conocer el recuento de los componentes sanguíneos siguiendo el siguiente protocolo:

- Diluir la muestra a estudio con DPBS según corresponda:
 - Médula ósea inicial: 1:1 (0,5 ml de DPBS y 0,5 ml de muestra)
 - Fracción mononucleada: 1:1 (0,5 ml de DPBS y 0,5 ml de muestra)
 - Producto final: 1:9 (0,1 ml de DPBS y 0,9 ml de muestra)
- Homogenizar bien con ayuda de la pipeta serológica y rotular el tubo con el lote y e iniciales del tipo de muestra (MOI o PF).
- Una vez preparada la muestra llevar el tubo al laboratorio de hematología para proceder a su recuento en el “Haemato Coulter”:
 - Seleccionar la opción de procesar en tubo abierto
 - A continuación se abrirá una ventana en la pantalla “ Configuración en tubo abierto”
 - Seleccionar la opción de Análisis Seleccionado
 - Identificar la muestra en el apartado ID MUESTRA sin poner espacios
 - Introducir el eppendorf en la sonda sin que ésta toque el fondo del tubo
 - Pulsar el botón situado detrás de la sonda. En ese momento se aspirará la solución celular. Cuando pare de aspirar retirar el tubo.
 - Cerrar ventana de “Configuración en tubo abierto” y pulsar registro final. En unos segundos aparecerá el recuento en la pantalla.
 - Imprimir resultado.

5.3.2.2. RECUESTO Y VIABILIDAD DE CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS CELULARES.

Este procedimiento se llevó a cabo para realizar recuentos tanto de las CSM expandidas como de las líneas celulares utilizadas como control. Se realizó a través del contador automático TC20™ siguiendo el siguiente protocolo:

- Dispensar 10 µl de la suspensión celular en un eppendorf de 0,5ml
- Dispensar 10 µl de Azul de Tripan sobre la suspensión celular
- Homogenizar la dilución con la micropipeta

- Encender el TC20™ y cargar en el porta de recuento celular 10ul de la dilución(Importante, este proceso debe de realizarse en el momento ya que el azul de tripan es tóxico para las células)
- Introducir el porta en la ranura del TC20™*

*los portas de recuento celular tienen dos cámaras identificadas como A y B, además se indica mediante flechas la posición correcta para introducirla en el TC20™.

- El recuento y viabilidad se realiza automáticamente apareciendo los siguientes valores en la pantalla: Total Count, Células Vivas/ml y % células Vivas
- Una vez que se ha realizado el recuento y se han recogido los datos en la guía correspondiente retirar el porta y presionar Home.

5.4. CONTROL DEL CRECIMIENTO.

La tasa de crecimiento celular de las CSM-MOFUC fue evaluada contando el número de células en cada pase y se expresó términos de CDP (*"Cumulative Population Doublings"* o Número de duplicaciones acumuladas) utilizando la fórmula $\text{Log } N / \text{Log } 2$, donde N es el número de células de la monocapa de cultivo confluyente obtenidas al ser despegadas dividido por el número inicial de células sembradas (347). Posteriormente se sumaban las duplicaciones obtenidas en todos los pases.

Por cuestiones de seguridad clínica, la expansión no debía exceder de 20 duplicaciones, para minimizar la administración de células senescentes, ya que después de 20 y 50 duplicaciones, las CSM humanas sufren senescencia replicativa con acortamiento de los telómeros y aumento de la expresión de p16 (395).

5.5 INMUNOFENOTIPO CSM.

La caracterización inmunofenotípica de las células mesenquimales se llevó a cabo siguiendo las pautas de la ISCT en las que se define a la célula mesenquimal como aquella célula que carece de marcadores hematopoyéticos como son el CD45 (marcador pan-leucocitario), el CD34 (característico de células hematopoyéticas inmaduras), CD14 (receptor del lipopolisacárido presente en células de estirpe monocítica) y HLA-DR (molécula presentadora de antígeno que se encuentra principalmente en Células Dendríticas, Células B , Células T activadas) y que coexpresan en su membrana CD105 (endoglina que forma parte del receptor del TGF-beta), CD73 (5'-nucleotidasa, enzima implicada en la conversión del AMP en adenosina) y CD90 (Proteína de anclaje al Glicofosfaditilinositol).

5.5.1. Materiales

- Micropipeta de 1-10 µL y de 10-100 µL
- Puntas de micropipeta.

- Tubos de plástico (4 por muestra)
- Caja para incubar en oscuridad
- Hielo seco
- Tubo Falcon 15ml
- Tubos Eppendorf
- Tubos poliestireno 5ml fondo redondo
- Agitador tipo vórtex
- DPBS
- SBF
- EDTA 0,5 M, pH 8.0; 2 mM
- FACS Flow (Beckman Coulter, California, USA)
- Flow Check (Beckman Coulter, California, USA)
- *Cocktail* anticuerpos CSM (Mesenchymal Stem Kit, MACS, Miltenyi Biotec, Alemania)
 - CD14- PerCP (Clon TÜK4 isotipo: mouse IgG2a)
 - CD20-PerCP (Clon LT20.B4, isotipo: mouse IgG1)
 - CD34- PerCP (Clon AC136, isotipo: mouse IgG2a)
 - CD45- PerCP (Clon 5B1, isotipo: mouse IgG2a)
 - CD73- APC (Clon AD2 isotipo: mouse IgG1)
 - CD90 FITC (Clon DG3 isotipo: mouse IgG1)
 - CD105 PE (Clon43A4E1 isotipo: mouse IgG1)
- *Cocktail* Isotipo (Mesenchymal Stem Kit, MACS, Miltenyi Biotec, Alemania)
 - Mouse IgG1- FITC (Clon IS5-21F5)
 - Mouse IgG1- PE (Clon IS5-21F5)
 - Mouse IgG1-APC (Clon IS5-21F5)
 - Mouse IgG1- PerCP (Clon IS5-21F5)
 - Mouse IgG2a- FITC (Clon S43.10)

5.5.2. Procedimiento

- Etiquetar 2 tubos indicando en uno Fenotipo CSM y en otro Isotipo
- Preparar el Buffer de marcaje (PBS/1% SBF/2 mM EDTA) en un Falcon de 15ml mantenido en frío. Teniendo en cuenta que se necesitarán:
- Homogenizar la muestra celular a estudio, dispensar en cada tubo el volumen de muestra correspondiente para conseguir 100.000 células/tubo.

- Centrifugar los 2 tubos a 300g durante 10 minutos en centrífuga a 4°C, decantando el sobrenadante.
- Añadir a cada tubo 100 µL de Buffer de marcaje y resuspender bien el pellet celular.
- Añadir al tubo de isotipo: 10 µL cocktail Isotipo diluído 1/10 en Buffer de marcaje. Homogenizar las células
- Añadir al tubo de Fenotipo MSC: 10 µL cocktail MSC diluído 1/10 en Buffer de marcaje y homogenizar las células
- Incubar los tubos 20 minutos a 4°C y en oscuridad.
- Añadir 1000 µL/tubo de Buffer de marcaje.
- Centrifugar los 2 tubos a 300g durante 10 minutos en centrífuga a 4°C, decantando el sobrenadante.
- Añadir 400 µL /tubo de Buffer de marcaje para resuspender el pellet celular marcado y proceder a su adquisición.

5.5.3. Adquisición y análisis de las muestras.

La adquisición se realizó en el citómetro de Flujo Navios (Beckman Coulter, CA, USA) equipado con tres láseres : láser azul a 488nm, láser rojo 638 nm y un láser violeta a 405nm , utilizando el programa Navios según protocolo normalizado de trabajo.

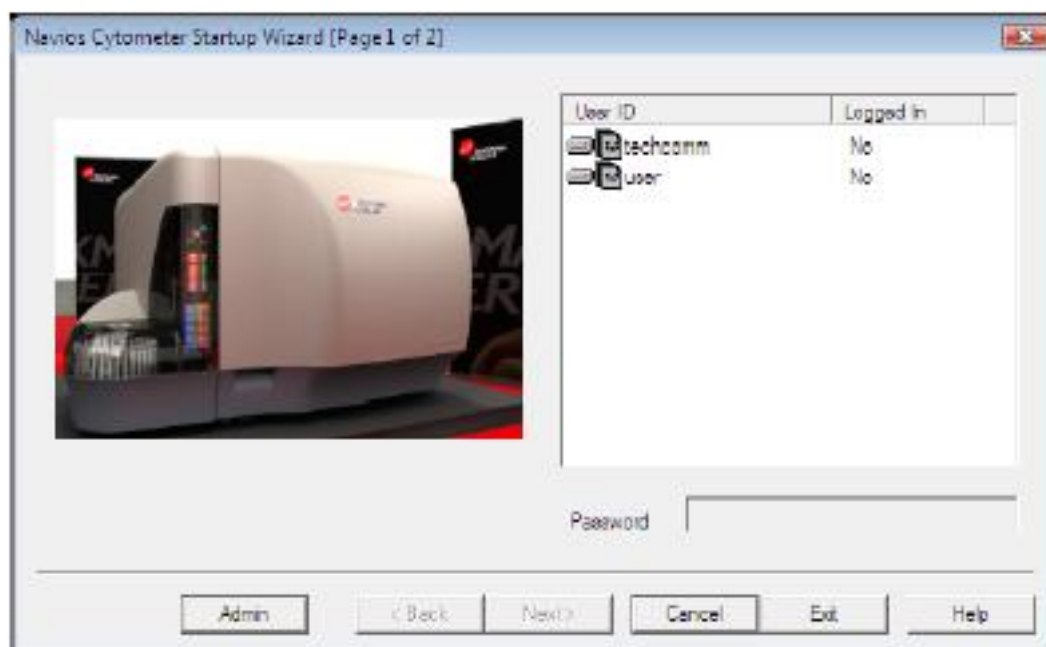


Figura 17. Programa para adquisición de muestras Navios.

Una vez adquiridas las muestras se procedió a su análisis con el software Kaluza siguiendo las pautas establecidas en el PNT-CC-009. En un primer paso se analizó por tamaño y

granularidad las células vivas, posteriormente se identificaron las células negativas para los marcadores hematopoyéticos y una vez seleccionadas estas células se caracterizan los marcadores positivos para las células mesenquimales.

5.6. ESTABILIDAD CROMOSÓMICA: CARIOTIPO.

La estabilidad cromosómica de las células mesenquimales cultivadas fue estudiada mediante cariotipo convencional para comprobar la ausencia de alteraciones numéricas y estructurales. Para ello se envió un frasco T175 (Sarstedt®, Alemania) en pase 2 o 3, dependiendo del lote, al 60% de confluencia de cada uno de los lotes de validación a la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se estudiaron 30 metafases y se cariotiparon 4, mediante tinción de bandas G.

5.7. NIVEL DE EXPRESIÓN C-MYC.

Remitimos un millón de células tanto fucosiladas como control de cada lote de validación embebidas en el reactivo de lisis *QIAzol Lysis Buffer* al Laboratorio de Inmunobiología y Genómica (IMBIOGEN), donde se llevó a cabo la extracción de RNA mediante el kit miRNeasy (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA se evaluó mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA se midió usando el kit RNA nano 6000 en un sistema de electroforesis capilar Bioanalyzer 2100 (Agilent), resultando en los 3 casos un RIN=10. Se utilizaron 100 ng de RNA de cada muestra para el análisis por qRT-PCR. Los RNA fueron retrotranscritos mediante el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), y sometidos a PCR usando el kit SYBR Premix Ex Taq (Takara) en un sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems), utilizando *primers* prediseñados QuantiTect (Qiagen) para MYC (QT00035406) y, como referencia para normalización, GAPDH (QT01192646). Antes de ensayar las células mesenquimales, se ensayó el método sobre RNA obtenido a partir de un panel de líneas celulares, y como resultado, los valores relativos extremos de expresión de c-myc se obtuvieron en las líneas DG-75 (valor=1) y Namalwa (valor≈5), y por lo tanto, fueron usadas como controles negativo y positivo, respectivamente. Se utilizó ADN control positivo clonal de la línea celular Namalwa y GP-75.

5.8. ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN.

5.8.1. Diferenciación osteogénica.

La diferenciación osteogénica se evaluó con muestras de los lotes usados en la validación del proceso. Las células se sembraron por cuadruplicado en DMEM estándar en placas de cultivo de 6 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) a una densidad de 1000 células/cm² manteniéndose a 37°C, 5% CO₂, y 95% de humedad. A los tres días se realizaba el cambio de medio en dos de los pocillos por el de diferenciación osteogénica NH Osteodiff Médium® (Miltenyi, Bistec, Alemania). Este medio estaba compuesto por β-glicerol fosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y

suero bovino fetal. Los otros dos pocillos se mantenían con el mismo DMEM utilizado en la siembra inicial. Estos cultivos se mantuvieron durante 4 semanas. El cambio de medio se realizaba cada 3-4 días. Transcurrido este tiempo, se seleccionaban dos pocillos (uno control y otro con medio de diferenciación) para la evaluación de la diferenciación osteogénica a través de la colocación de la actividad de fosfatasa alcalina con el sustrato NBT (SIGMA FAST BCIP/NBT) (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y otros dos para la investigación de los depósitos de calcio utilizando el colorante Alizarin Red (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

Para la coloración de la actividad de fosfatasa alcalina, se retiraba el medio de cultivo y se lavaban los cultivos con DPBS, fijándose con metanol frío al 70% (Química Clínica aplicada, España) durante 5 minutos. Para comprobar la diferenciación se analizaba la actividad fosfatasa alcalina mediante tinción con la solución NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche, Basel, Suiza) durante 10 minutos. De existir fosfatasa alcalina, ésta procesaba el sustrato y las células se teñían de color púrpura oscuro. Para la coloración con el Alizarín Red, se realizaba el mismo procedimiento de lavado y fijación con metanol, incubándose 30 minutos con el colorante a temperatura ambiente. Los depósitos de calcio se colorearían de color naranja con el Alizarin Red.

5.8.2. Diferenciación adipogénica

La diferenciación adipogénica se evaluó tras 4 semanas en cultivo. Las células se sembraban por duplicado en DMEM estándar en a una densidad de 1000 cél/cm² manteniéndose a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad del 95%. Se reemplazaba el medio cada tres días hasta que las células alcanzaban el 70-80% de confluencia. En este momento una de las muestras continuaba con DMEM (control negativo) y a la otra se le sustituía por el medio de diferenciación NH Adipo-diff Médium (Miltenyi Biotec, Alemania). Para comprobar la existencia de acúmulos lipídicos citoplasmáticos se utilizó la tinción con *Oil Red*[®] (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Para ello se retiraba el medio de cultivo de las placas, se lavaba dos veces con DPBS fijándose con metanol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiraba el metanol y se lavaba con agua destilada añadiéndose 2 ml de Oil Red a cada pocillo, manteniéndose en agitación lenta durante 20 minutos a temperatura ambiente. La diferenciación adipogénica se evidenciaba por la presencia de vacuolas citoplasmáticas cargadas de grasas neutras coloreadas de rojo-naranja.

5.8.3. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica se evaluó tras 4 semanas en cultivo. Se realizó en cultivos de micro-masa utilizando el medio de inducción NH ChondroDiff (Miltenyi Biotec MACS Media, Bergisch Gladbach, Alemania), estandarizado para la diferenciación condrogénica in vitro de las CSM de médula ósea. Las células se preparaban a una concentración final de 2.5x10⁵ células/mL de medio estándar, se resuspendían y se colocaban en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. Los tubos se centrifugaban a 150 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se les retiraba el DMEM y las células se resuspendían en 1 ml del medio NH ChondroDiff (Miltenyi Biotec MACS

Media, Bergisch Gladbach, Alemania) pre-calentado a 37°C. De nuevo se centrifugaban a la misma velocidad, tiempo y temperatura, tras lo cual se incubaban en posición vertical en estufa a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% y humedad de 95%. El medio se reemplazaba cada tres días. Como control se cultivaron células en DMEM estándar. A los 24 días se procedió a la preparación de la muestra para evaluar la diferenciación condrogénica a través de la detección de colágeno II por coloración de los proteoglicanos por citoquímica. Para ello, se retiraba completamente el NH ChondroDiff, se lavaba el pellet celular con DPBS y se fijaba en formaldehído al 4% en DPBS durante toda la noche. Al día siguiente se incluyeron los nódulos en parafina. Se cortaron secciones de los mismos de 5 micras y se colocaron sobre porta-objetos, secándolos en estufa a 37°C. Para la investigación de los proteoglicanos por citoquímica se fijaron los porta-objetos con etanol al 95% y se tiñeron posteriormente con una solución de Azul Alcian al 1% en ácido acético glacial al 3 %.

5.9. VERIFICACIÓN FUCOSILACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

El objetivo de este análisis es el control del proceso de fucosilación de CSM mediante citometría de flujo de células mesenquimales humanas expandidas *in vitro* y se lleva a cabo en el Área de Control de Calidad de la UPC del HCUVA, donde está ubicado el citómetro de flujo.

5.9.1. Materiales y equipos.

- Micropipeta de 1-10 µL y de 10-100 µL
- Puntas de micropipeta
- Tubos de poliestireno de 5ml con fondo redondo
- Caja para incubar en oscuridad
- Hielo
- Tubo Falcon 15ml (BD Falcon, USA)
- Tubos Eppendorf (Eppendorf, Deltalab, Barcelona)
- Agitador tipo vórtex
- Albúmina sérica Humana (Grifols, Barcelona, España)
- Hepes (Euroclone, Europa)
- SBF (Gibco, Life Technologies, Reino Unidos)
- EDTA 0,5 M (Sigma Aldrich, USA)
- CaCl₂
- HECA 452 (BD PharMingen, San Diego, USA)
- Goat anti-rat IgM-FITC (Cell Lab, California, USA)
- CD44-PE (R&D Systems, Minnesota, USA)
- Anti E-selectina quimérico (R&D Systems, Minnesota, USA)
- Anti human IgG-Biotin (R&D Systems, Minnesota, USA)

- Streptavidina (R&D Systems, Minnesota, USA)

5.9.2. Desarrollo.

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizan en el Área de Control de Calidad de la Unidad de Producción Celular y siguiendo las pautas de “Normas generales de trabajo en zonas clasificadas”.

5.9.2.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Buffer Control (50 ml)

- Hepes: 250 μ l
- Fetal Bovine Serum (FBS): 2,5 ml
- HBSS: 47,25 ml
- EDTA (5 mM): 0,5 ml (se encuentra en la nevera a 0,5 M)

Buffer Chimera (20 ml) CaCl₂ 2 mM

- Hepes: 100 μ l
- FBS: 1 ml
- CaCl₂: 400 μ l
- HBSS: 18,5 ml

Buffer lavado (50 ml)

- DPBS: 49,37 ml
- SBF: 0,5 ml
- EDTA: 0,2 ml

5.9.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se rotularon 22 tubos de citometría y se inoculó cada uno de ellos con 100.000 década muestra. A continuación se añadió 1 ml de buffer lavado y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. Decantamos el sobrenadante y procedimos a la incubación durante 30 minutos en hielo y oscuridad con los diferentes anticuerpos (tabla 6) en 100 μ l de buffer de lavado, buffer quimera (con calcio) o buffer control (sin calcio) según la determinación. Entre cada incubación se realizaron dos lavados a 300 g durante 5 minutos con los tampones correspondientes. Al final del marcaje se resuspendieron las células en 500 μ L de buffer lavado y se procedió a su adquisición en el citómetro de flujo.

5.9.2.3. ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA

- Poner en marcha el citómetro de Flujo Navios™ situado en el Dpto. de Control de Calidad de la UPC siguiendo los pasos indicados en el PNT-CC-007.
- Seleccionar el protocolo de adquisición “fucosilación”.

- Identificar la muestra con el código del experimento y la fecha.
- Colocar los tubos con la muestra en el citómetro para sea adquiridas y una vez adquirida proceder a su análisis.

5.9.2.4. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

El análisis de las muestras se realiza en el software Kaluza siguiendo las pautas establecidas en un PNT. En un primer paso se seleccionan las células vivas y sobre esta población se analizan la expresión de los marcadores HECA452, CD44 y E-Selectina.

MATERIAL Y MÉTODOS

MUESTRA	Nº TUBO	DETECCION	ANTICUERPO 1º	ANTICUERPO 2º	ANTICUERPO 3º
KG1a	1	HCELL		2 µl α-Rat-FITC	
	2		2µl HECA452	2 µl α-Rat-FITC	
RPMI CONTROL	3	HCELL		2 µl α-Rat-FITC	
	4		2µl HECA452	2 µl α-Rat-FITC	
RPMI FUCOSILADAS	5	HCELL		2 µl α-Rat-FITC	
	6		2µl HECA452	2 µl α-Rat-FITC	
CSM CONTROL	7	HCELL		2 µl α-Rat-FITC	
	8		2µl HECA452	2 µl α-Rat-FITC	
	9	CD44			
	10		10µL α-CD44s PE		
	11	E- SELECTINA SIN Ca ₂ Cl		1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	12		1 µL de Quimera	1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	13	E- SELECTINA CON Ca ₂ Cl		1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	14		1 µL de Quimera	1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
CSM FUCOSILADAS	15	HCELL		2 µl α-Rat-FITC	
	16		2µl HECA452	2 µl α-Rat-FITC	
	17	CD44			
	18		10µL α-CD44s PE		
	19	E- SELECTINA SIN Ca ₂ Cl		1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	20		1 µL de Quimera	1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	21	E- SELECTINA CON Ca ₂ Cl		1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>
	22		1 µL de Quimera	1 µL αHum IgGBiot	0.2µL <u>Streptavidi-</u>

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la validación de la fucosilación por citometría de flujo.

5.10. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MEDICAMENTO

La fucosilación es una modificación transitoria, de manera que la expresión de HCELL en las células fucosiladas se mantiene estable durante 24 horas, haciéndose progresivamente indetectable en torno a las 96 horas, probablemente debido al propio *turnover* de la proteína de superficie, dado que no se producen cambios en los niveles de CD44 observados mediante citometría de flujo (396). El objetivo de este estudio fue validar la estabilidad de la suspensión de mesenquimales fucosiladas en solución salina fisiológica, para comprobar que la caducidad, tiempos, condiciones de almacenamiento y transporte establecidos garantizaban la estabilidad y la calidad del producto final.

5.10.1. Materiales y equipos

- Suero salino al 0,9 % (Grifols, Barcelona, España)
- Muestra de células mesenquimales fucosiladas
- Micropipetas
- Citómetro de Flujo Navios™
- Cámara frigorífica
- Kit Annexin-V/Pacific Blue (Immunostep, Salamanca, España)
- Binding Buffer (diluído 1/10 en DPBS) (Immunostep, Salamanca, España)
- Heca 452 (BD Pharmingen™, San Diego, EEUU)
- Goat anti-rat IgM-FITC (Cell Lab, California, USA)
- Pipetas 10ul ,100ul y 500ul (Sarstedt)
- Puntas de pipetas de 10, 100 y 1000ul
- PBS (Gibco, Estados Unidos)
- Tubos de de poliestireno de fondo redondo de 5 ml.

5.10.2. Descripción del método

El estudio de la estabilidad del medicamento de terapia celular “Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas” se realizó mediante el seguimiento de los parámetros: fenotipo, viabilidad y estabilidad de la formación de HECA durante las 48 horas siguientes al proceso de fucosilación con el fin de demostrar que las células fucosiladas no cambian su fenotipo durante al menos ese tiempo (244).

El estudio Fenotípico y de la expresión de HECA mediante citometría de flujo se realizó siguiendo el protocolo descrito en apartados anteriores. La viabilidad celular por citometría de flujo se midió usando el marcador Ioduro de propidio (IP) y la Anexina V.

La Annexin V es un marcador de la fosfatidilserina. En células vivas se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y cuando la célula entra en apoptosis realiza “*Flip-Flop*” hacia la cara externa, permitiendo distinguir células vivas y las apoptóticas (mediante el marcaje

negativo o positivo para Anexina V respectivamente). El IP es un marcador de viabilidad celular que sólo entrará en aquellas células que tienen poros en la membrana como pueden ser células apoptóticas y necróticas.

Preparación de la muestra

- Conocido el recuento, diluir la muestra en PBS hasta obtener 1×10^6 células/ml.
- Añadir 100 μ l de CSM-MOFUC y 100 μ l de Binding buffer a un tubo de citometría.
- Añadir 10 μ l de Annexin V Pacific Blue y 10 μ l de IP.
- Incubar la muestra en hielo 15 minutos.
- Añadir 1ml de Binding Buffer y centrifugar la muestra a 1500 rpm durante 5 minutos.
- Decantar el sobrenadante y añadir 400 μ l de Binding buffer.

Adquisición de la Muestra

- Poner en marcha el citómetro de Flujo Navios™ situado en el Dpto. de Control de Calidad de la UPC siguiendo los pasos indicados en el PNT-CC-006.
- Seleccionar el protocolo de adquisición “AnnexinV”.
- Identificar la muestra con el código del experimento y la fecha.
- Colocar el tubo con la muestra en el citómetro para sea adquirida y una vez adquirida proceder a su análisis.

Análisis de la Muestra

- Cargar el protocolo de análisis de AnnexinV en el programa Navios.
- Ajustar el “gate” de FSC y SSC discriminando los eventos no celulares.
- Ajustar los cuadrantes en el *Plot* AnnexinV y 7AAD para obtener los porcentajes de células vivas (ANNEXIN V-/IP-), apoptóticas (ANNEXIN V+/IP-), apoptóticas tardías (ANNEXIN V+/IP+), y muertas (ANNEXIN V-/IP+).

RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DEL CULTIVO Y LA FUCOSILACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA HUMANA SIN UTILIZACIÓN DE REACTIVOS ANIMALES.

Las CSM-MO se cultivaron de forma paralela suplementando el medio con suero bovino fetal y con tratamiento enzimático para despegar las células de la superficie de cultivo (MEDIO 1) o con lisado plaquetario y ausencia total de derivados animales (MEDIO 2). Una vez fucosiladas se analizó la eficacia de la técnica a nivel molecular y funcional por citometría de flujo, western-blot y “stamper woodrof assay” con los siguientes resultados.

1.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS INMUNOFENOTÍPICO.

En primer lugar mostramos los resultados obtenidos mediante citometría de flujo de las líneas control empleadas para comprobar la actividad de la enzima fucosiltransferasa VI (FTVI) y la afinidad del tetrasacárido sLe^x por el anticuerpo monoclonal HECA452 que se reflejan en la Fig. 18:

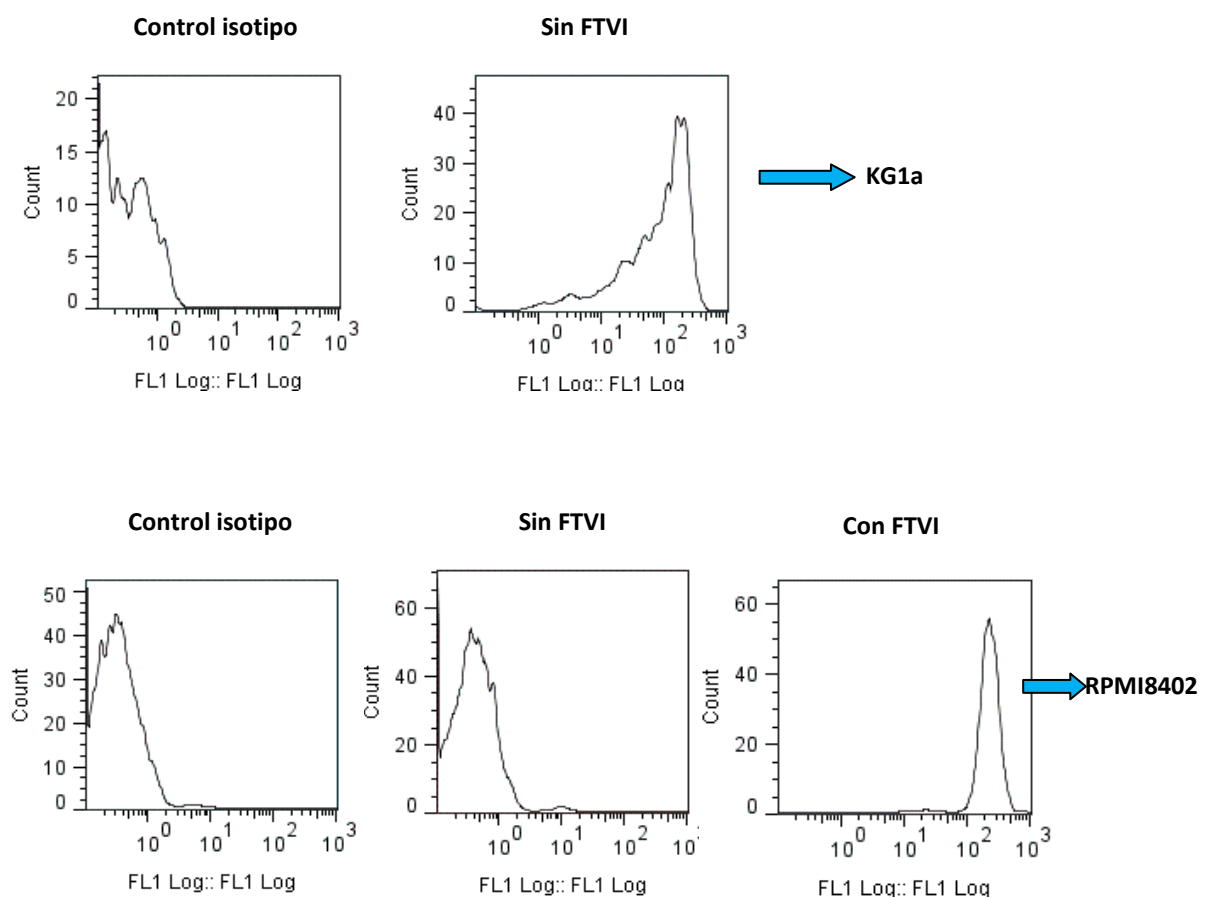


Figura 18. Niveles de expresión de HECA452 en las líneas control. Perfil de expresión de HECA452 en la línea KG1a (arriba) y RPMI8402 no tratadas y tratadas con FTVI (abajo). Los gráficos de la izquierda muestran el control isotópico.

RESULTADOS

- KG1a: esta línea celular que expresa de manera constitutiva la estructura HCELL reaccionó con el anticuerpo HECA452 (Figura 18, arriba a la derecha).
- RPMI8402: esta línea celular que posee residuos de lactosamina sializados susceptibles de fucosilación y por tanto de formación de HCELL en su superficie, reaccionó con HECA452 tras la exofucosilación (Figura 18, abajo a la derecha) mientras que sin tratamiento con FTVI los niveles eran indetectables (Figura 18, abajo en el centro).

Al analizar el nivel de expresión de HECA452 en las células cultivadas en Medio 1 (suplementado con SBF) y Medio 2 (suplementado con LP), ambas presentaron reactividad para dicho anticuerpo (Figura 19 y 20).

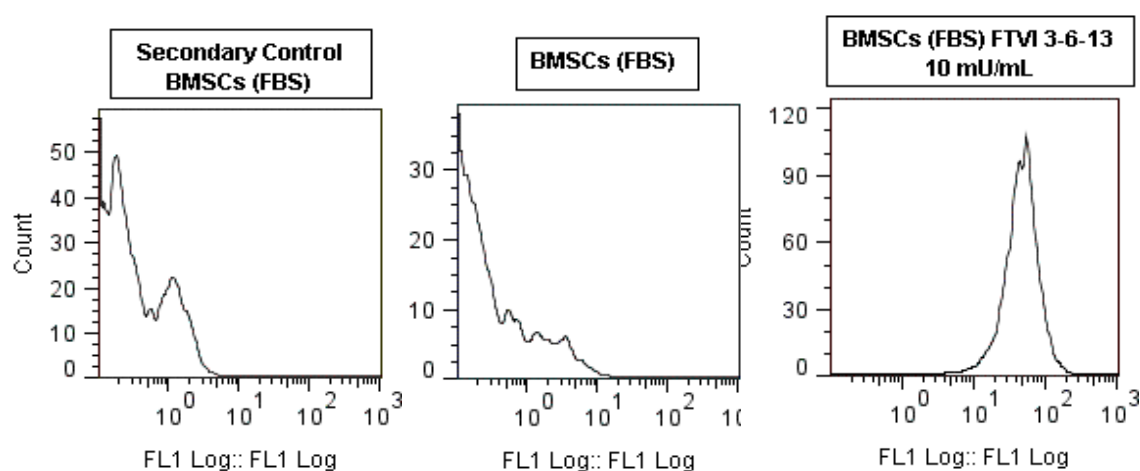


Figura 19. Histograma de expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con SBF tras el tratamiento con FTVI. El histograma de la izquierda muestra el control isotópico, el del centro la expresión de HECA452 en células sin tratamiento y el histograma de la derecha muestra la expresión de dicho anticuerpo en CSM-MO cultivadas en presencia de SBF, tras ser tratadas con FTVI.

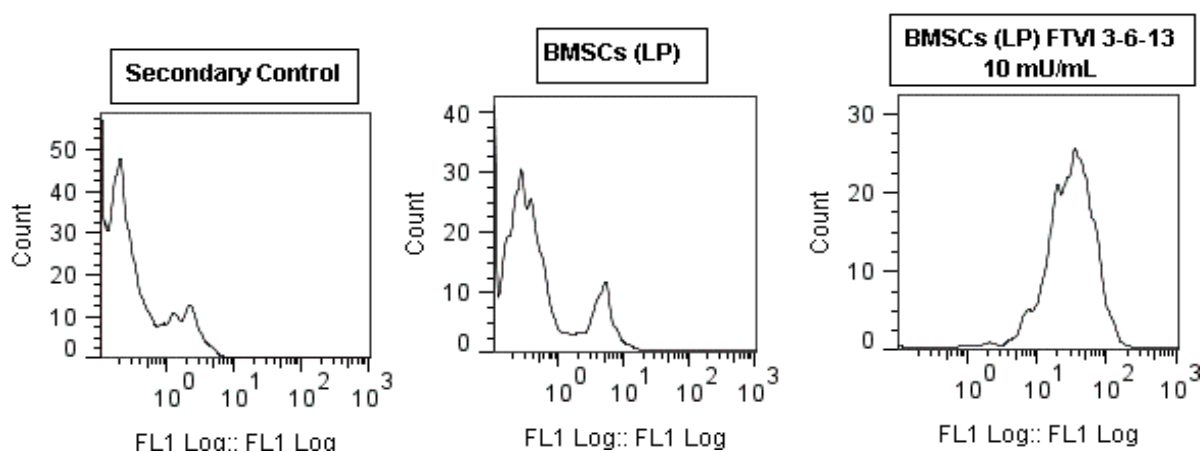


Figura 20. Histograma de expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con LP tras el tratamiento con FTVI. El histograma de la izquierda muestra el control isotópico, el del centro la expresión de HECA452 en células sin tratamiento y el histograma de la derecha muestra la expresión de dicho anticuerpo en CSM-MO cultivadas en presencia de LP, tras ser tratadas con FTVI.

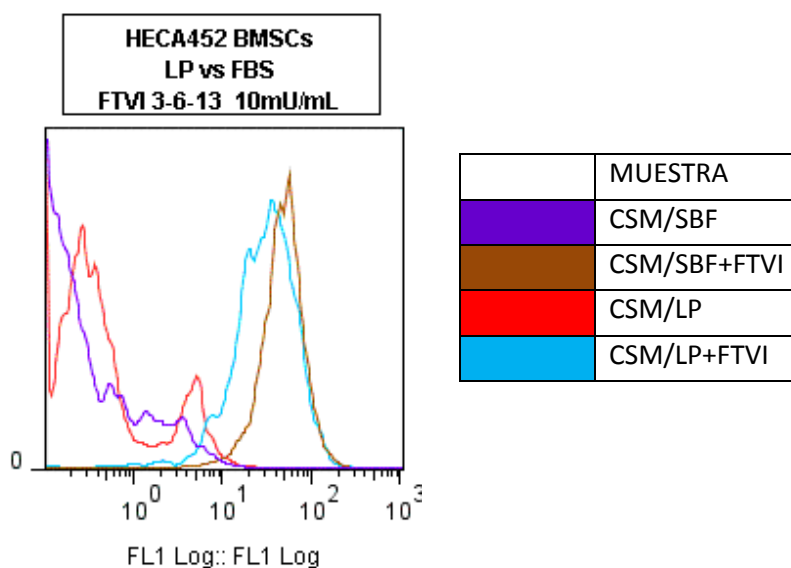


Figura 21. Análisis comparativo por citometría de flujo de la expresión de HECA452 en CSM-MO cultivadas con SBF y LP tras exofucosilación. La línea morada, CSM-MO cultivadas en Medio 1 (SBF), la línea marrón representa a las mismas células tratadas con FTVI, la línea roja, CMS-MO cultivadas en Medio 2 (LP) y la línea azul, CSM-MO cultivadas con LP y tratadas con FTVI.

La reactividad a HECA452 de las CSM-MO cultivadas en ambas condiciones aumentó considerablemente después del tratamiento con FTVI (Figura 21), lo que se traduce en un aumento del tetrasacárido sLex.

1.2. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE HCELL POR WESTERN BLOT.

Con el fin de estudiar el complejo proteico sobre el que había tenido lugar la adición de fucosa por medio de la FTVI; los lisados celulares de las CSM-MO cultivadas en Medio 1 y Medio 2, se sometieron a análisis electroforético utilizando condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Los gels de acrilamida electro transferidos con la fracción proteica se incubaron con los anticuerpos HECA452 (que reconoce sLe^x), Sack-1 (anticuerpo monoclonal producido por el Dr. Sackstein que reconoce un glicano de CD44 α 2,3-sializado) y la quimera de E-Selectina (que simula a la E-selectina endotelial). Como control se utilizaron extractos de la línea celular KG1a y RPMI8402.

La mayor parte de los puntos antigénicos detectadas con HECA452 (Figura 22, **A**) se hayan a una altura correspondiente a unos 90-100 KDa (bandas 1, 5 y 6) con idéntica posición a la banda detectada con el anticuerpo que reconoce CD44 (Figura 22, **C**). Esto mismo sucede cuando las membranas son incubadas con el anticuerpo quimérico para E-selectina en presencia de Calcio (**B**). Sin embargo, esta reactividad no se hace visible ni con HECA452 (**A**) y ni con la quimera (**B**) para las RMPI8402 (banda 2), y para las CSM que no han estado en contacto con la enzima FTVI (bandas 3 y 4) independientemente del medio de cultivo que se haya utilizado. La línea KG1a puede ser detectada con los tres anticuerpos ya que ésta presenta de forma constitutiva el CD44 sialofucosilado mientras que en caso de la línea celular RMPI8402 sólo posee el CD44 sializado.

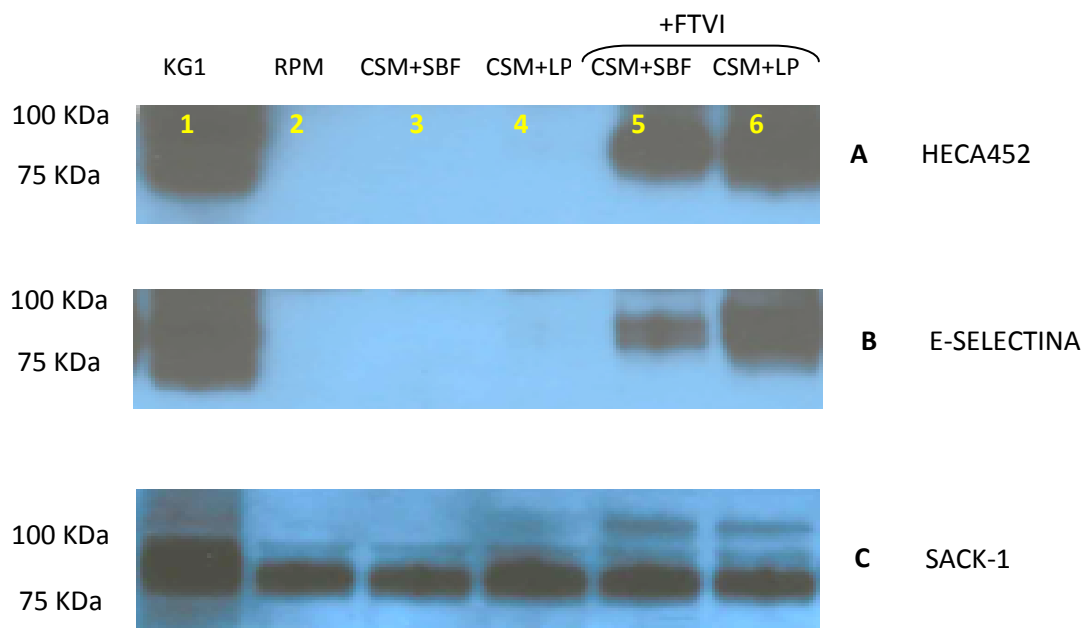


Figura 22. Western Blot de KG1a y CSM-MOFUC con suero bovino fetal (SBF) y lisado plaquetario (LP). Línea 1, extracto total de lisado de KG1a; línea 2, extracto total de RPMI8402; líneas 3 y 4, extracto total de lisado de CSM cultivadas en Medio 1 (SBF) y Medio 2 (LP) respectivamente; líneas 5 y 6, extracto total de lisado de CSM fucosiladas. Los resultados son representativos de experimentos llevados a cabo en CSM de médula ósea de donantes con una n=3.

Estos datos sugieren:

- Que la adición de fucosa tiene lugar en el antígeno de superficie CD44, ya que las bandas que aparecen tanto en **A** como en **B** son superponibles a las bandas que se detectan con el anticuerpo SACK-1 (que detecta CD44 sializado).
- Que el tratamiento con FTVI genera el tetrasacárido sLe^x, ya que las CSM tratadas con dicho enzima reaccionan con HECA452, mientras que las no tratadas no, independientemente del protocolo de cultivo que se haya utilizado.
- Que la nueva estructura es capaz de unirse a al anticuerpo quimérico de E-selectina.

1.3. RESULTADOS DE FUNCIONALIDAD: STAMPER WOODRUFF ASSAY.

Como se ha mencionado anteriormente, la α (1,3) fucosilación del CD44 de la superficie de las CSM-MO confiere capacidad ligando tanto para E-selectina como para L-selectina. Esta técnica (“Stamper Woodruff Assay”), desarrollada por primera vez en 1976 ha sido adaptada en este trabajo para demostrar la capacidad de unión de la molécula HCELL generada por fucosilación en las CSM a la L-Selectina expresada en la superficie de los linfocitos (246,247,397). Para ello se llevó a cabo un ensayo de adherencia de linfocitos de sangre periféricas en presencia de calcio (ya que expresan L-selectina en su membrana) sobre CSM-MO exofucosiladas fijadas a la superficie de un porta por citocentrifugación (Figura 23).

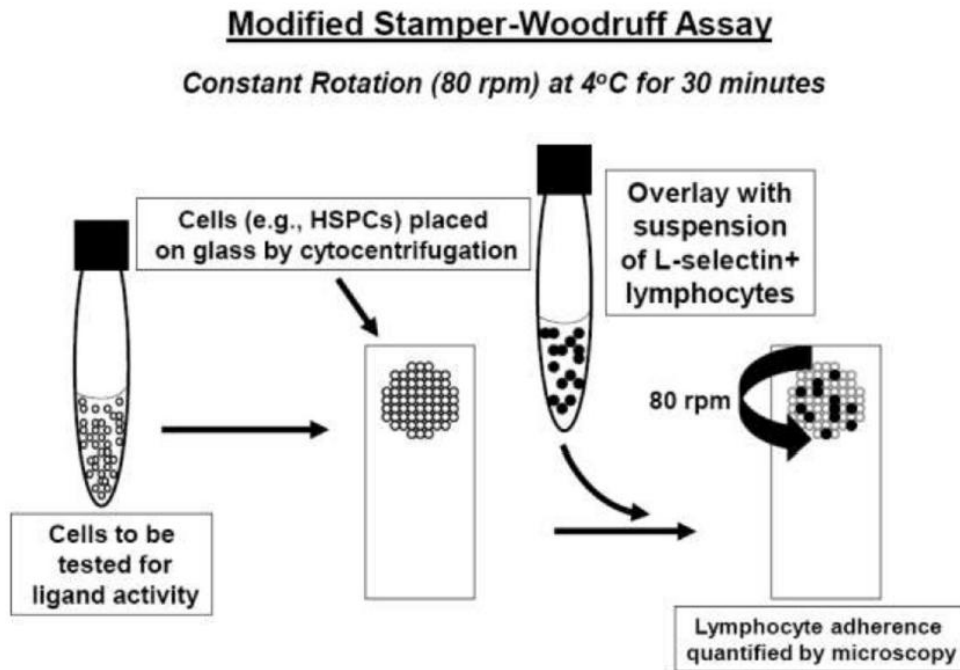


Figura 23. Esquema del ensayo Stamper-Woodruff. Tomado de Sackstein 2012.

Se analizaron paralelamente CSM-MO cultivadas en ambas condiciones a estudio (Medio 1 y Medio 2) antes y después de ser tratadas con FTVI y la línea celular control KG1a. Los linfocitos se adherían a las CSM fucosiladas tanto cultivadas con suero bovino fetal (Medio 1) como con lisado plaquetario (Medio 2) de la misma manera que lo hacían sobre las células KG1a. Esta adhesión se pudo comprobar por microscopía óptica (Figura 25). Sin embargo, la tasa de adherencia sobre células sin fucosilar era menor (Figura 24). Estos datos indican que la incubación con FTVI promueve la adhesión a linfocitos mediada por L-Selectina.

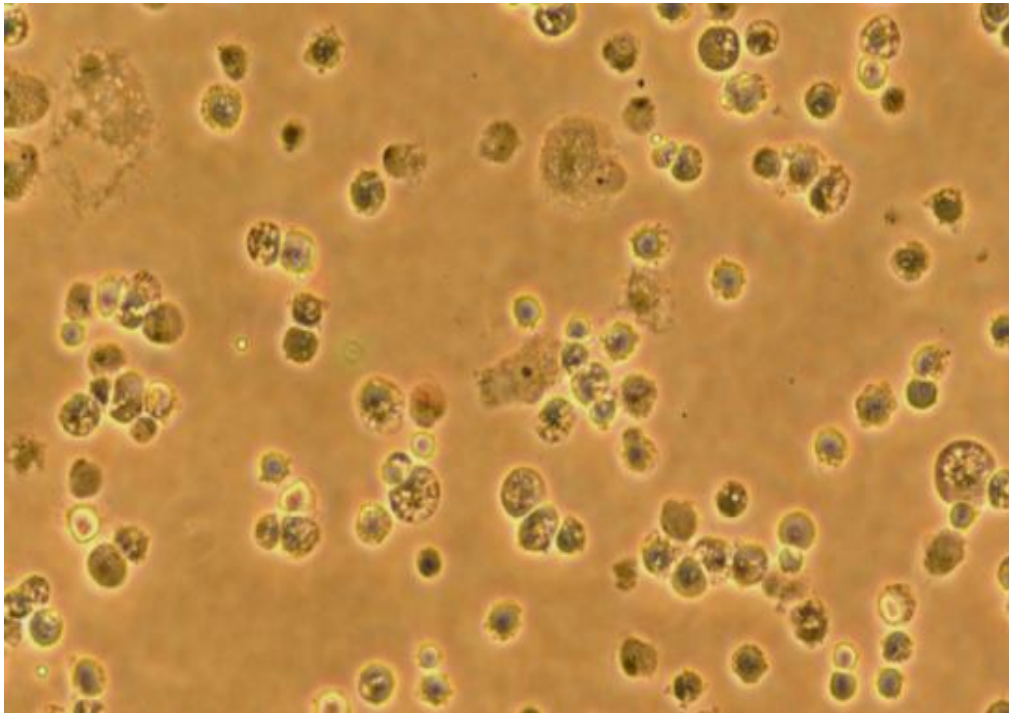


Figura 24. Preparación con CSM-MO cultivadas con lisado plaquetario tras incubarse con linfocitos de sangre periférica. Puede observarse la adhesión de linfocitos refringentes a las CSM.

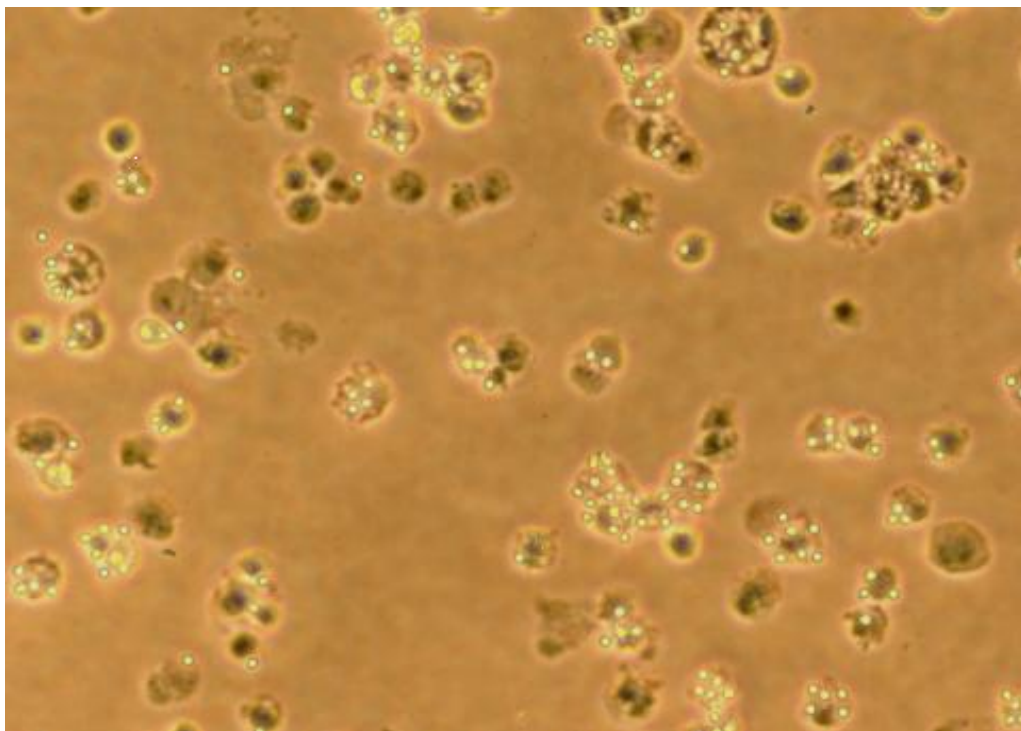


Figura 25. Preparación con CSM-MO fucosiladas tras incubarse con linfocitos de sangre periférica. Puede observarse la adhesión de linfocitos refringentes a las CSM.

2. RESULTADOS DE LA ELABORACIÓN DEL SISTEMA DOCUMENTAL.

Siguiendo las pautas descritas en el punto 4 del apartado Material y métodos, se elaboraron un total de 40 documentos directamente relacionados con el proceso de fabricación del medicamento CSM-MO-FUC, con la validación del proceso aséptico y la del proceso productivo de dicho medicamento en investigación. Por motivos de confidencialidad se desarrolla como ejemplo el contenido de un procedimiento normalizado de trabajo (“Cultivo primario de células mononucleadas”) y se incluyen ejemplos de un registro (“Obtención de material biológico de partida”), una especificación (“Médula ósea humana”) y una guía de fabricación de lote (“Fucosilación de células mesenquimales troncales adultas de MO expandidas”).

Los documentos generados se enumeran a continuación:

- Fórmula patrón de fabricación del medicamento “células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas y fucosiladas”.
- Especificaciones (SS)
 - Bolsa *pool* plaquetar.
 - Lisado de plaquetas.
 - Material biológico de partida: Médula ósea humana.
 - Producto final: Células madre mesenquimales troncales adultas autólogas de MO expandidas fucosiladas.
- Protocolos normalizados de trabajo (PNT):
 - Obtención, alicuotado y almacenamiento de lisado plaquetario.
 - Preparación de medios empleados para el cultivo y expansión de células troncales mesenquimales de MO humanas.
 - Preparación y transporte del kit de obtención de médula ósea humana
 - Obtención de médula ósea humana.
 - Obtención de la fracción mononucleada de médula ósea por método automatizado con procesador celular Sepax.
 - Cultivo primario de células mononucleares de médula ósea.
 - Expansión de células mesenquimales de médula ósea humana.
 - Fucosilación de células madre mesenquimales troncales adultas autólogas de MO expandidas.
- Guías de fabricación de lote (GFL). En nuestro sistema, se utilizan guías de fabricación de lote como documento en el que se recoge toda la información e instrucciones para fabricar un lote de producción y permite el registro y recogida de datos de un lote de producto

durante su proceso de fabricación. Son generadas a partir de la correspondiente fórmula patrón.

- Guía de Obtención del material biológico de partida.
 - Guía de obtención de la fracción mononucleada de médula ósea.
 - Guía de cultivo primario de células mesenquimales de médula ósea.
 - Guía de cambio de medio de cultivo de la expansión de células mesenquimales troncales adultas de MO.
 - Guía de pase de cultivo de la expansión de células mesenquimales troncales adultas de MO.
 - Guía de fucosilación de células mesenquimales troncales adultas de MO expandidas.
 - Guía de aprobación, liberación y distribución de CSM-MOFUC
- Registros (REG).
- Solicitud para la obtención y procesamiento de progenitores de médula ósea.
 - Registro de obtención de material biológico de partida.
 - Preparación de medio 1.
 - Preparación de medio 2.
 - Registro y codificación de medios de cultivo.
 - Registro de obtención, alicuotado y almacenamiento de lisado plaquetario.
 - Registro y codificación de lisado plaquetario.
 - Registro fotográfico de morfología celular.
 - Registro de almacenamiento de Banco Celular de Reserva.
 - Manual de uso del medicamento en investigación CSM-MO-FUC.
 - Formulario de solicitud de envío de Medicamento en investigación.
 - Registro de recepción y administración de medicación.
 - Certificado de liberación de lote del medicamento CSM-MO autólogas fucosiladas.
- Validación del proceso aséptico (Media Fill) de producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.
- Protocolo de validación del Media Fill de producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - GFL del media fill producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - Informe de validación del Media Fill de producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.

- Validación prospectiva del proceso de producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - Protocolo de validación de producción de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - Informe de validación.
- Estudio de estabilidad de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - Protocolo ensayo de estabilidad de CSM-MO autólogas fucosiladas.
 - Resultados e informe del estudio de estabilidad de CSM-MO autólogas fucosiladas

2.1. EJEMPLO DE PNT: “CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA” (PNT-P-011.02).

2.1.1. Objetivo.

Describir la técnica de cultivo primario de células mononucleadas de médula ósea humana.

2.1.2. Ámbito de aplicación.

Este procedimiento es de aplicación a los cultivos de células mononucleadas de médula ósea que se lleven a cabo en el Área de producción de la Unidad de Producción Celular (UPC) del Servicio de Hematología del HCUVA para obtener células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea humanas expandidas in vitro que serán empleadas como Medicamento de Terapia Celular en el contexto de Ensayos Clínicos.

Lo lleva a cabo personal del Departamento de Producción, siguiendo los requisitos planteados en las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF/ GMP).

2.1.3. Responsabilidades.

Es responsabilidad de todo el personal de la UPC la correcta aplicación y seguimiento de las pautas establecidas en este procedimiento.

Departamento de Producción: llevar a cabo todo el procesamiento para el cultivo primario de la fracción leucocitaria mononucleada.

Departamento de Control de Calidad: verificación de controles ambientales y de calidad durante el proceso.

2.1.4. Materiales y equipos.

- Centrífuga (Awel, Francia)
- Cabina de Seguridad Biológica de tipo II clase A (Esco, Singapur)

- Incubador celular 37°/5% humedad y 5% CO₂ (Esco, Singapur)
- Pipeteador automático (Hirschmann, Alemania)
- Calculadora
- Pipetas serológicas de 1 (Sarstedt, Francia), 5, 10 y 25 ml (Falcon, USA)
- Factorías Nunc 4 pisos (2520 cm²)/ 2 pisos (1260 cm²)/ Frascos de cultivo T175
- Paño de campo estéril 50 x 50 (Cover, Málaga, España)
- Criotubo 2 ml (Greiner Bio-one, Alemania)
- Tubos estériles tipo Falcon de 15 y 50 ml (BD Falcon, USA)
- Vaso de precipitados de 500ml (en caso de sembrar una factoría de 2P)
- Punzón acoplador para toma de muestras (Fenwal, USA)
- Jeringa 50 ml estéril con conexión “luer loc” (BD, España)
- Jeringa de 1 ml estéril (Nipro, Bélgica)
- Aguja de 21 G (BD, España)
- Frascos de cultivo bacteriológico para aerobios y anaerobios (Biomerieu, Francia)
- Contenedor de residuos biológicos
- Placa de sedimentación para control ambiental en proceso y para impronta de guantes (Biomerieu, Francia)
- Medio 1 (DMEM+ 5% lisado plaquetario + 0.04 % Heparina sódica al 1% (2UI/ml) + 50 µg/ml Gentamicina
- DPBS (Gibco, Reino Unido)
- Células mononucleadas de médula ósea

2.1.5.Desarrollo.

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizan en una cabina de seguridad biológica de tipo II Clase A, ubicada en el Área de producción (clasificación B) de la Unidad de Producción Celular y siguiendo las pautas de “Normas generales de trabajo en zonas clasificadas.

Preparación de materiales y consideraciones iniciales.

- Preparar el material e introducirlo en la sala a través del SAS de preparación de materiales.
- Colocar dentro de la cabina una placa de sedimentación para el control ambiental de la misma indicando fecha, hora, código de cabina y lote. Esta placa debe cambiarse por otra una vez hayan transcurrido 4h de exposición.
- Preparar las botellas de Medio 1 que sean necesarias en función de la cantidad (ml) de células que se vayan a sembrar a razón de 160.000 células mononucleares/cm².

Procesamiento para siembra inicial:

- Tomar a través del SAS de preparación de materiales la bolsa que contiene las células mononucleadas después de ser procesadas en el Sepax y aprobadas como material de partida por Control de Calidad.
- Aseptizarla e introducirla en cabina, abrir uno de los puertos de la bolsa y conectar un sampling.
- Tomar una jeringa de 50 ml y enroscarla en dicho sampling y aspirar el contenido de la bolsa con la jeringa, anotar en la GFL el volumen obtenido y verterlo en un tubo Falcon de 50ml.
- Centrifugar a 730g durante 10 minutos en centrífuga a 4oC.
- Aspirar con jeringa de 1 ml y aguja de 21G 0,4 ml del sobrenadante e inocular 200 µl en cada frasco del sistema BacT-Alert.
- Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet obtenido en 5 ml de MEDIO-1.
- Tomar una muestra de 200 µl para recuento en un tubo criotubo de 2 ml.
- Sacar por el SAS de control de calidad los Bact-Alert y el criotubo para que sean cursados. Una vez que se nos comunica el recuento, se calcula el número de frascos T175 o factorías de 2 o 4 pisos necesarios para sembrar las CMN de MO a razón de 160.000células/cm2.

Siembra en factorías de cultivo:

- Etiquetar todos los recipientes de cultivo necesarios para la siembra

CSM-MOFUC-OSP/001-P0.1-11/06/14

Lote 001 de CSM de MO fucosiladas para el tratamiento de la osteoporosis.

- Añadir el medio de cultivo
- Equilibrar el nivel de líquido tumbando la factoría sobre el lateral del orificio con tapón azul.

- Girar la factoría 90º de modo que los dos tapones queden arriba. Espera unos segundos hasta que el contenido se reparta uniformemente entre las distintas cámaras.



Desenroscar el tapón blanco de la factoría y verter la mezcla decantándola a través de este orificio. Coloca de nuevo el tapón.



Equilibrar el nivel de líquido tumbando la factoría sobre el lateral del orificio con tapón azul.



Girar la factoría 90º de modo que los dos tapones queden arriba. Espera unos segundos hasta que el contenido se reparta uniformemente entre las distintas cámaras.



Finalmente, sujetándola de los lados, inclina cuidadosamente la factoría hasta que quede en posición horizontal.

Figura 26. Esquema ilustrativo del procedimiento de llenado de la factoría de cultivo.

- Finalmente, sujetándola de los lados, inclinar cuidadosamente la factoría hasta que quede en posición horizontal.
- Introducir los frascos de cultivo o factorías cuidadosamente en el incubador, de manera que las etiquetas identificativas queden visibles desde el exterior e incubar a 37°C y 5% CO₂.
- El primer cambio de medio se realizará transcurridas las 24 horas.

2.1.6. Referencias

- PNT-P-010 “Normas generales de trabajo en zonas clasificadas”
- PNT-P-013 “Preparación de medios empleados para el cultivo y expansión de células madre mesenquimales de médula ósea humanas”
- PNT-P-018 “Expansión de células Mesenquimales de médula ósea humana”
- PNT-GC-006 “Etiquetado de materiales, muestras y producto terminado.”
- PNT-CC-004 “Procedimiento para el control microbiológico de productos biológicos”.
- PNT-CC-008 “Procedimiento para el control de viabilidad y recuento celular”.

2.1.7. Historial de revisiones

Versión	Cambios realizados	Fecha

2.1.8. Registros

Los siguientes registros forman parte del “Expediente de Fabricación de Lote” y son archivados en el Archivo de la UPC por Dpto. Garantía de Calidad durante 30 años:

- GFL-003 “Cultivo primario de células mononucleadas de médula ósea”.

2.1.9. Anexos**Hoja firmas protocolo.**

HE LEÍDO ÍNTEGRAMENTE Y COMPRENDO EL CONTENIDO DE ESTE PROTOCOLO

NOMBRE	FECHA	FIRMA

Control de copias emitidas

Nº copia	Nombre y cargo	Firma*	Fecha entrega	Fecha retirada

* Con su firma el personal se compromete a leer y aplicar este procedimiento, así como a darlo a conocer a las personas a su cargo.

2.2. EJEMPLO REG: "REGISTRO DE LA OBTENCIÓN DE MO COMO MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA" (REG-PNT-P-012-01.02).

UPC-Servicio Hematología <i>Arrascaeta</i> <small>CONSEJO REGULADOR "MÉDULA ÓSEA HUMANA"</small>		REGISTRO DE OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA		Fecha vigencia: 20/11/13
Código y versión: REG-PNT-P-012-01.02		Prox. revisión: Noviembre 2016	Elaborado (Nombre, fecha, firma): María Dolores López Lucas 18/11/13 <i>[Firma]</i> Revisado (Nombre, fecha y firma): Darío Sánchez Salinas, 19/11/13 <i>[Firma]</i> Ana María García Hernández 19/11/13 <i>[Firma]</i> Aprobado (Nombre, fecha, firma): Ana María García Hernández 20/11/13 <i>[Firma]</i>	Pag.: 1 de 1

OBTENCIÓN DE MÉDULA ÓSEA:

Ensayo clínico: _____

EudraCT: _____

Código del paciente: _____

Comprobación datos del paciente: _____ NHC: _____

Fecha y hora de obtención: ___/___/___ : ___h

Facultativos que realizan el procedimiento: _____

Volumen Total extraído: ml

Incidencias durante la extracción: SI NO

Características de la extracción/incidencias, especificar:

ETIQUETA
 ACONDICIONAMIENTO 1º MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA

Figura 27. Registro de obtención del material biológico de partida (MO) asociado al PNT-P-012.

2.3. EJEMPLO DE ESPECIFICACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO DE PARTIDA (MÉDULA ÓSEA HUMANA) (SP-CC-001.03).

PRODUCTO	Médula ósea humana(MO)
FORMA FARMACEUTICA	Suspensión celular en bolsa de hemoderivados
PROVEEDOR	Material biológico autólogo obtenida por facultativos del Servicio de Hematología del HCUVA
CONDICIONES ALMACENAMIENTO	Temperatura Ambiente
PERIODO DE CADUCIDAD	24 horas
OTROS REQUISITOS	NA

CARACTERISTICA-REQUISITO-PARÁMETRO DE CALIDAD	VALOR (limites aceptación)	METODO ENSAYO
Serología paciente VIH, VHB, VHC, sífilis, HLTV I y II PCR VHC (si serología positiva)	Serología y PCR VHC negativas realizadas en los 30 días previos a la obtención de la MO	Antígeno-Anticuerpo DNA
Volumen Medula Ósea	≥ 30 ml	Análisis Vi- sual/Verificación Regis- tro obtención
Apariencia	Ausencia de coágulos groseros	Análisis Visual
Envase/ contenedor	Integro y sellado	Análisis Visual
Etiquetado	Completo y correcto	Análisis Visual

Figura 28. Especificación de la médula ósea humana como material biológico de partida.

2.4. EJEMPLO DE GFL DE FUCOSILACIÓN DE CSM-MO ADULTAS EXPANDIDAS (GFL-008.01).

UPC-Servicio Hematología <i>Arriaza</i>	GUIA FABRICACIÓN DE LOTE 008 (PNT-P-019) FUCOSILACIÓN DE CELULAS MESENQUIMALES TRONCALES ADULTAS DE MEDULA OSEA EXPANDIDAS		Fecha vigencia: 14/05/15																																							
Código y versión: GFL-008.01	Prox. revisión: Mayo 2018	Elaborado (Nombre, fecha, firma): María Dolores López Lucas, 12/05/15	Pag.: 1 de 8																																							
Nº LOTE:		Revisado (Nombre, fecha y firma): Carmen Alguro Marín 13/05/15																																								
FECHA:		Dario Sánchez Salinas 13/05/15 Ana María García Hernández, 13/05/15 Aprobado (Nombre, fecha, firma): Ana María García Hernández, 14/05/15																																								
Indice: <ol style="list-style-type: none"> 1. Materiales. 2. Controles iniciales. 3. Consideraciones previas. 4. Procedimiento 5. Cuarentena del Medicamento 6. Preparación del Kit de Transporte 																																										
1. MATERIALES (realizado por Dpto. Producción)																																										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>MATERIAL</th> <th>CIP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td><input type="checkbox"/> Pipeteador automático</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Micropipetas</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Centrífuga</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 50, 15 y 1,5 ml</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 2ml</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Contador celular</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Lineas celulares control (para control de calidad)</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 4 placas de sedimentación para control ambiental</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Rotulador indeleble</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 1 juego de Bact-Alert</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 1 vial Albúmina Humana</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Hank's Balanced Salt solution (HBSS)</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> GDP fucosa a 50 mM</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> DPBS</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> Hepes 1M</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 1 bolsa de Suero salino de 100 ml</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 4 tubos de 15 ml</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 4 tubos de 50 ml</td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> 7 criotubos de 2 ml</td><td></td></tr> </tbody> </table>		MATERIAL	CIP	<input type="checkbox"/> Pipeteador automático		<input type="checkbox"/> Micropipetas		<input type="checkbox"/> Centrífuga		<input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 50, 15 y 1,5 ml		<input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 2ml		<input type="checkbox"/> Contador celular		<input type="checkbox"/> Lineas celulares control (para control de calidad)		<input type="checkbox"/> 4 placas de sedimentación para control ambiental		<input type="checkbox"/> Rotulador indeleble		<input type="checkbox"/> 1 juego de Bact-Alert		<input type="checkbox"/> 1 vial Albúmina Humana		<input type="checkbox"/> Hank's Balanced Salt solution (HBSS)		<input type="checkbox"/> GDP fucosa a 50 mM		<input type="checkbox"/> DPBS		<input type="checkbox"/> Hepes 1M		<input type="checkbox"/> 1 bolsa de Suero salino de 100 ml		<input type="checkbox"/> 4 tubos de 15 ml		<input type="checkbox"/> 4 tubos de 50 ml		<input type="checkbox"/> 7 criotubos de 2 ml		
MATERIAL	CIP																																									
<input type="checkbox"/> Pipeteador automático																																										
<input type="checkbox"/> Micropipetas																																										
<input type="checkbox"/> Centrífuga																																										
<input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 50, 15 y 1,5 ml																																										
<input type="checkbox"/> Gradilla para tubos de 2ml																																										
<input type="checkbox"/> Contador celular																																										
<input type="checkbox"/> Lineas celulares control (para control de calidad)																																										
<input type="checkbox"/> 4 placas de sedimentación para control ambiental																																										
<input type="checkbox"/> Rotulador indeleble																																										
<input type="checkbox"/> 1 juego de Bact-Alert																																										
<input type="checkbox"/> 1 vial Albúmina Humana																																										
<input type="checkbox"/> Hank's Balanced Salt solution (HBSS)																																										
<input type="checkbox"/> GDP fucosa a 50 mM																																										
<input type="checkbox"/> DPBS																																										
<input type="checkbox"/> Hepes 1M																																										
<input type="checkbox"/> 1 bolsa de Suero salino de 100 ml																																										
<input type="checkbox"/> 4 tubos de 15 ml																																										
<input type="checkbox"/> 4 tubos de 50 ml																																										
<input type="checkbox"/> 7 criotubos de 2 ml																																										

Figura 29. Guía de fabricación de lote de fucosilación de células mesenquimales troncales adultas de MO expandidas.

3. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA ESTERILIDAD DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN (MEDIA FILL).

Las tres pruebas de simulación del proceso de producción fueron llevadas a cabo en la campana de flujo laminar (Grado A) en entorno grado B y supervisadas siempre por el Dpto. de Control de Calidad, Dpto. de Producción y Dpto. de Garantía de Calidad.

3.1. RESULTADOS DEL TEST DE IDONEIDAD.

Antes de llevarse a cabo la prueba de simulación con el medio nutritivo BHI se realizó el test de promoción de crecimiento de cada lote de BHI utilizado para asegurarnos de que este medio permitía el crecimiento de microorganismos contaminantes, tal como se describe en el apartado material y métodos. Se testaron los lotes utilizados en cada validación tanto antes de la ser utilizados como después de pasar por todo el sistema en cada procedimiento. Para ello se inocularon 6 muestras del lote de BHI utilizado en el proceso de validación pre y post proceso con las cepas que dicta la Farmacopea. Tras incubación de 14 días, se evaluaron de forma visual. Observamos que todos los tubos presentaron turbidez del medio, signo de crecimiento microbiano, excepto el tubo control en el que no se inoculó ninguna cepa, que se mantuvo transparente (Figura 30).

El primer tubo que aparece en la imagen de la figura 30 se corresponde con el medio BHI sin inoculación (Control), el segundo tubo fue inoculado con el hongo *Aspergillus brasiliensis* que como otros hongos filamentosos, presenta un crecimiento moteado. El resto de tubos fueron inoculados con *Candida albicans* (tercer tubo), *Clostridium sporogenes* (cuarto tubo), *Pseudomonas aeruginosa* (quinto tubo), *Bacillus subtilis* (sexto tubo) y *Staphylococcus aureus* (séptimo tubo), todos ellos presentaron una turbidez homogénea. Los tubos presentan diferente volumen por las pérdidas de medio en el proceso de simulación al ser puesto en contacto con todo el sistema.

El microorganismo responsable de la turbidez de cada tubo de BHI fue aislado e identificado en medio selectivo (Agar sangre) por el Servicio de Microbiología del HCUVA, confirmando la identidad de la cepa del inóculo inicial (Figura 31).

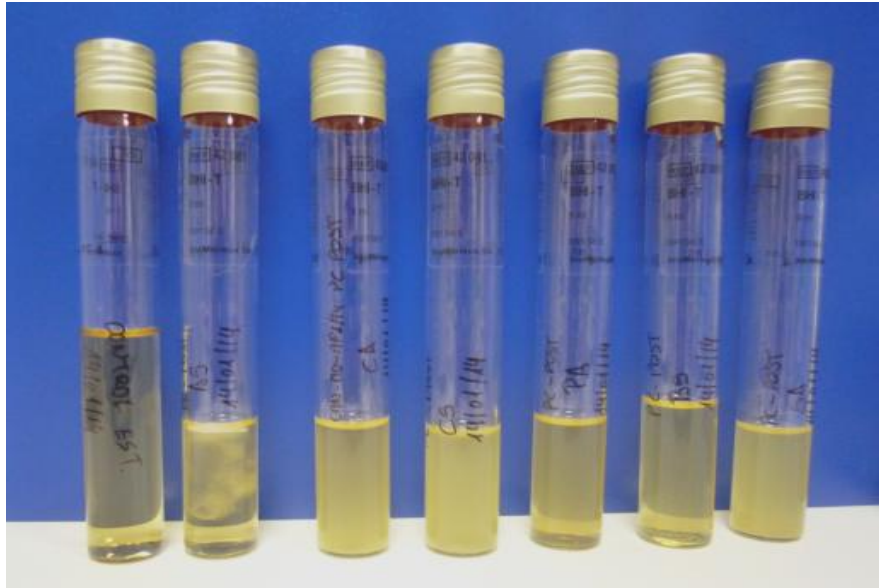


Figura 30. Turbidez del medio BHI por crecimiento de las distintas cepas inoculadas.

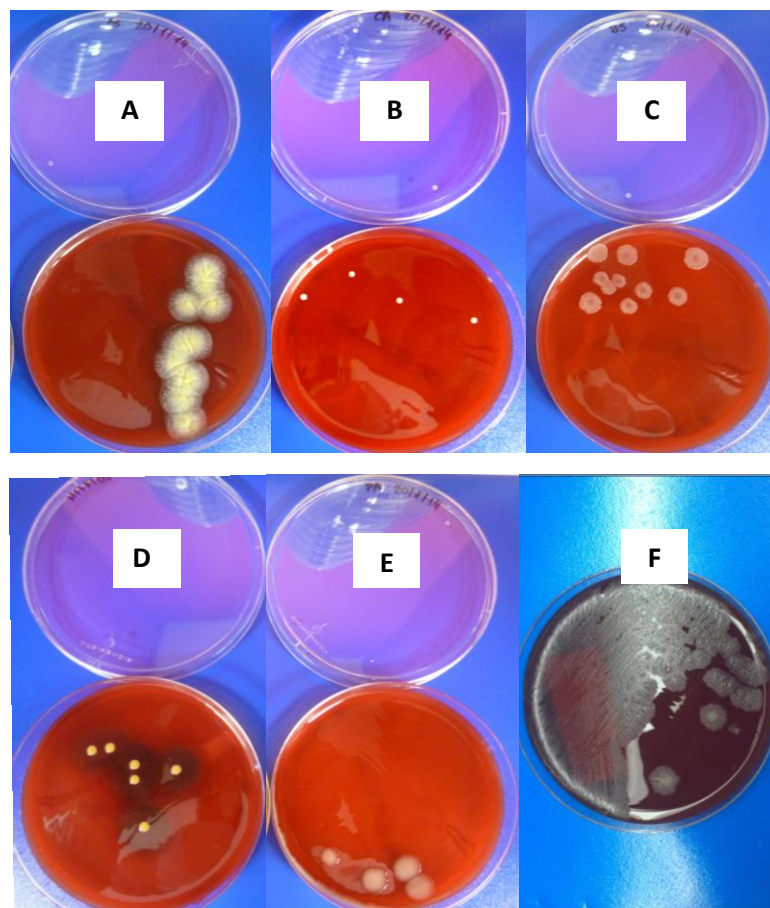


Figura 31. Crecimiento en placas de Agar Sangre de las cepas utilizadas para el test de idoneidad del BHI. A) *Aspergillus brasiliensis*; B) *Candida albicans*; C) *Bacillus subtilis*; D) *Staphylococcus aureus*; E) *Pseudomonas aeruginosa* F) *Clostridium sporogenes*, bacteria Gram negativa anaerobia que tuvo que ser aislada en cámara de anaerobiosis.

RESULTADOS

La prueba de promoción de crecimiento del lote de BHI utilizado fue correcta, observando crecimiento (turbidez) de las cepas inoculadas en las muestras de BHI tanto pre y como post-proceso. Estos resultados se muestran a continuación:

3.1.1. Promoción del crecimiento Pre-simulación.

CIP: BHI-0007

Fecha de la Inoculación: 26/05/15

Fecha de la verificación: 15/06/15 +: turbidez (crecimiento)/ -: no turbidez (no crecimiento)

Días incubación 9ml BHI + 55 CFU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium sporogenes	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Candida albicans	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aspergillus brasiliensis	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.1.2. Promoción del crecimiento Post-simulación.

CIP: BHI-0007

Fecha de la Inoculación: 26/05/15

Fecha de la verificación: 15/06/15 +: turbidez (crecimiento)/ -: no turbidez (no crecimiento)

Días incubación 9ml BHI + 55 CFU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium sporogenes	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Candida albicans	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aspergillus brasiliensis	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.2. INFORME VALIDACIÓN DEL PROCESO ASÉPTICO (MEDIA FILL) CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TROCALES ADULTAS AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSEA.

No se observó presencia de microorganismos en ninguna de las tres repeticiones en el punto sometido al control de esterilidad de los tres procesos de media fill realizado por cada uno de los operarios sometidos a validación. Los niveles de partículas y el resto de controles ambientales estaban dentro de los límites de aceptación.

Validación Proceso Aséptico

CIP: BHI-0007

Fechas Proceso de Validación: 26-05-15/ 27-05-15/ 28/05/15

Ías incubación Lote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CSM-MO-MF1/15-CAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF2/15-CAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF3/15-CAA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF1/15-MMM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF2/15-MMM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF3/15-MMM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF1/15-SLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF2/15-SLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF3/15-SLC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF1/15-LLL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF2/15-LLL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSM-MO-MF3/15-LLL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Resultados Media Fill del cultivo y expansión de CSM-MO.

Tras cada una de las validaciones del proceso aséptico la documentación generada: guías de fabricación, registros e informes microbiológicos correspondientes se archivaron conformando el expediente de lote de cada proceso. El protocolo de validación del media fill así como el informe que recoge los resultados de las tres pruebas de simulación del proceso se enviaron al departamento de inspección y control de la AEMPS para su evaluación.

4. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE CSM-MO FUCOSILADAS.

Los materiales utilizados en el proceso son de proveedores homologados por la UPC, han sido almacenados en condiciones adecuadas y previamente aprobados por el Departamento de Control de Calidad. Los equipos utilizados en se encuentran al corriente de cualificación, mantenimiento y limpieza y están registrados en las GFL correspondientes.

Todo el personal implicado en este proceso de validación ha sido entrenado de forma apropiada en este protocolo, quedando registrado en la hoja de firmas del mismo.

Se han fabricado cuatro lotes de células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas. A continuación se muestran los resultados de las especificaciones y controles de calidad llevados a cabo en cada uno de los lotes fabricados.

4.1. RESULTADOS DE LA OBTENCIÓN DE MO HUMANA.

Las muestras fueron obtenidas de donantes voluntarios tras la correspondiente firma del consentimiento informado (**Anexo II**). El primer lote se obtuvo a partir de médula ósea de una donante sana de 44 años (CSM-MOFUC-V/001). El segundo a partir de la descongelación del banco celular de reserva del primer lote (BCR-CSM-MOFUC-V/001), ya que nuestro protocolo contempla la congelación de dicho banco como *back-up* en caso de pérdida de lote y queríamos demostrar nuestra capacidad de llegar a dosis dentro de especificaciones partiendo de un banco de células criopreservadas. El tercer y cuarto lote (CSM-MOFUC-V/002 y CSM-MOFUC-V/003) lo obtuvimos a partir de médula ósea de dos donantes osteoporóticas de 64 y 74 años respectivamente.

Antes de proceder a la extracción de MO se validó la serología de cada donante, siendo esta negativa para todos los virus y antígenos requeridos en los tres donantes. Una vez conocida la serología se coordinó la extracción con los hematólogos del Servicio de Hematología del HCUVA y el personal de quirófano. El día de la extracción se preparó el contenedor de transporte con todo el material necesario para llevar a cabo el harvest (**Anexo III**) y se envió al quirófano siguiendo las instrucciones descritas en el PNT correspondiente. La médula ósea fue extraída según por los hematólogos en el quirófano.



Figura 32. Kit de obtención del material biológico de partida (MO).

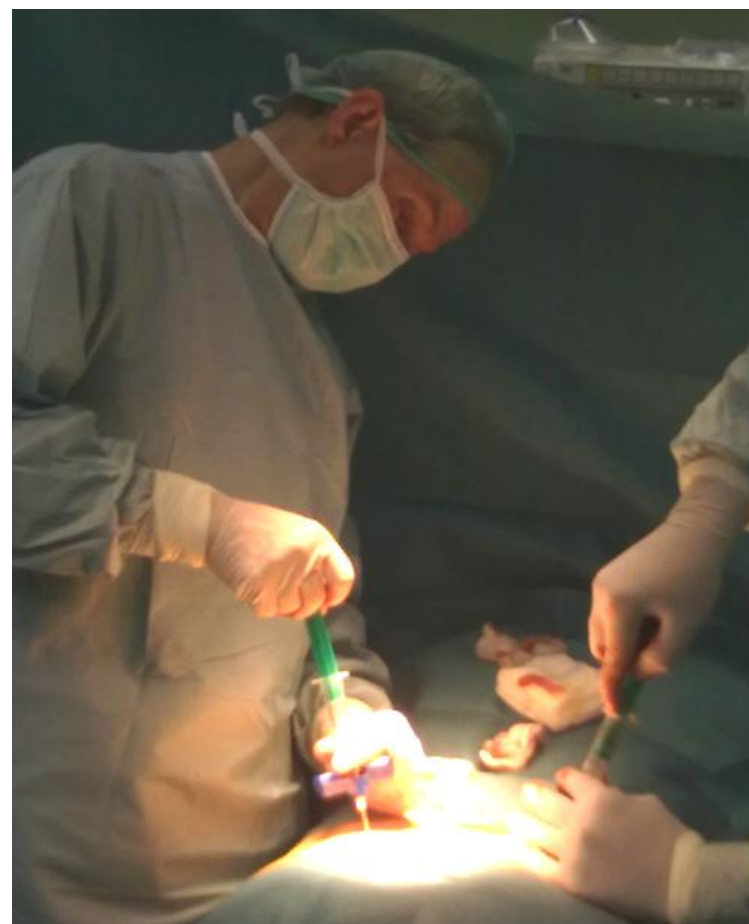


Figura 33. Harvest de médula ósea.

RESULTADOS

Una vez que se extrajo la médula ósea se envió a la UPC donde fue revisada por el Dpto. de Control de Calidad para verificar el cumplimiento de las especificaciones (SP-CC-001.03). Todos los lotes cumplieron los requerimientos.

REQUERIMIENTO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO			
		V/001	BCR-V/001	V/002	V/003
Serología paciente VIH, VHB, VHC, sífilis, HLTV I y II PCR VHC	Negativa	NEGATIVA	NA	NEGATIVA	NEGATIVA
Volumen Medula Ósea	≥ 30 ml	120 ml	NA	60 ml	60 ml
Apariencia	Ausencia de coágulos	Sin coágulos	NA	Sin coágulos	Sin coágulos
Envase/ contenedor	Integro y sellado	Integro y sellado	NA	Integro y sellado	Integro y sellado
Etiquetado	Completo y correcto	Completo y correcto	NA	Completo y correcto	Completo y correcto

Tabla 8. Requisitos y criterios de aceptación del material biológico de partida

4.2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MONONUCLEADA DE MO CON PROCESADOR SEPAX.

Una vez aprobada, la bolsa de MO se introdujo en la cabina de flujo laminar donde se filtró y preparó para ser procesada con el procesador celular Sepax-X100 según PNT correspondiente.



Figura 34. Preparación del kit de obtención de la fracción mononucleada en el procesador celular Sepax.



Figura 35. Colocación del kit del Sepax. Bolsa de MO a la izquierda y la de seroalbúmina a la derecha.

Finalizado el proceso de separación de la fracción mononucleada de la MO, de asepticizó la bolsa de recogida del kit que contenía las células mononucleadas (Figura 36) y se introdujo en ambiente B a través del SAS de Preparación de Materiales (Figura 37). Una vez en B, se tomó una muestra de la fracción mononucleada obtenida para realizar un recuento en Haemato Coulter tal y como se describe en el punto 6.4.2.1.

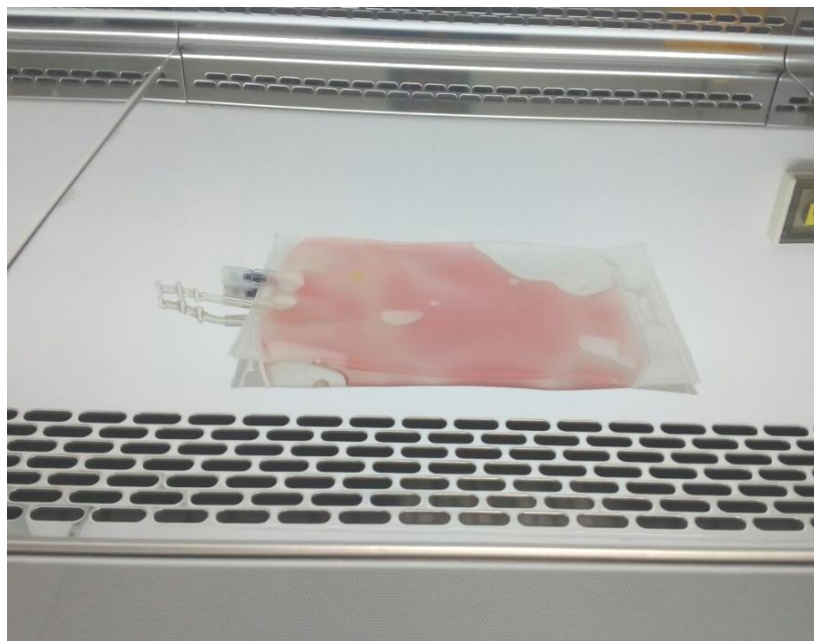


Figura 36. Bolsa de producto del Sepax con células mononucleadas en su interior.



Figura 37. Técnico de producción abriendo la puerta del SAS para recoger la bolsa de CMN.

4.3. RESULTADOS DEL CULTIVO Y EXPANSIÓN DE CSM-MO.

Se realizó un cultivo primario de las CMN-MO (PNT-P-011.02) (ver ejemplo en apartado 2 de Resultados) y se fueron realizando pases según PNT correspondiente a las CSM hasta alcanzar la dosis deseada, momento en el que fueron fucosiladas. Al tratarse de una validación y no haber indicación de dosis, el objetivo de dosis se fijó previamente entre 100 y 200 millones de células. El recuento y viabilidad celular se determinaron con el contador celular automático tal y como se describe en el punto 6.4.2.2. La viabilidad evaluada con Trypan blue fue mayor del 75% en todas las muestras.

LOTE	PASE	CELULAS OBTENIDAS	DUPLICACIONES
CSM-MO-FUC-V/001	3	100x10 ⁶	9.9
BRC-CSM-MO-FUC-V/001	3	100x10 ⁶	7.61
CSM-MO-FUC-V/002	2	200x10 ⁶	4.4
CSM-MO-FUC-V/003	3	130x10 ⁶	7.22

Tabla 9. Número de células, pase y número de duplicaciones de las células despegadas para fucosilación.

Durante el proceso de expansión se llevó a cabo un registro fotográfico en cada pase. Todas las muestras mostraron la morfología típica en huso con núcleo central alargado con 2-3 nucléolos (Figura 38). Esta morfología fue constante en el 100% de las muestras analizadas.

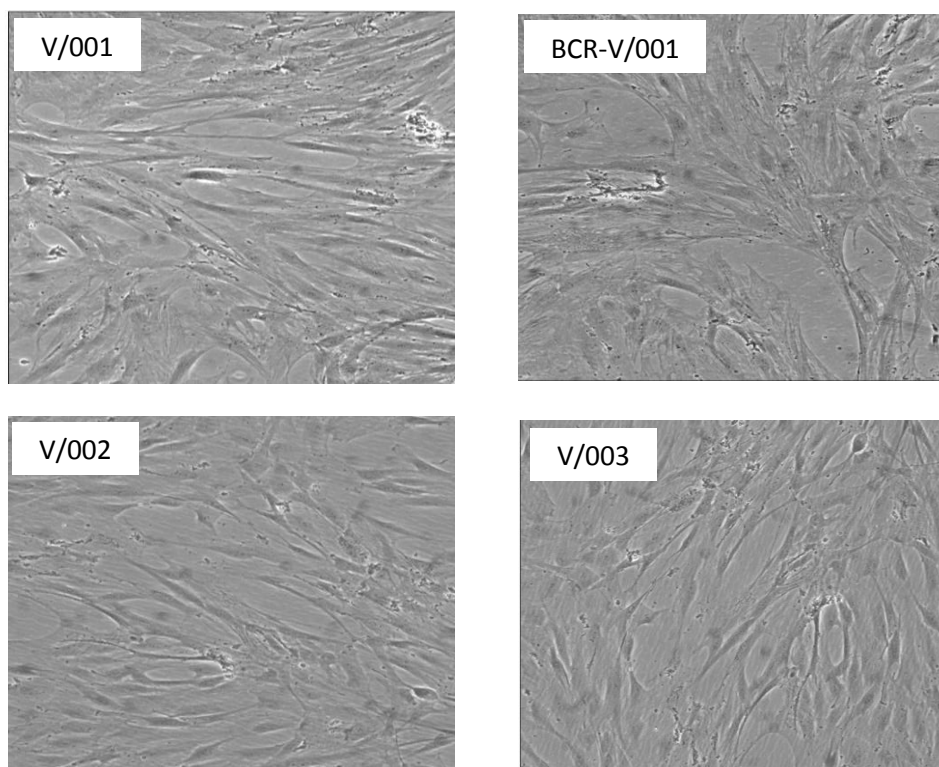


Figura 38. Imágenes de las CSM-MOFUC de todos los lotes en el pase previo a la fucosilación.

4.4. RESULTADOS DE LA FUCOSILACIÓN DE CSM-MO

Una vez despegadas, las células de los cuatro lotes de validación fueron fucosiladas y envasadas según protocolo. Del producto final se tomaron muestras para realizar todos los controles de calidad que se han ido citando en el apartado 5 de Material y Métodos.

4.4.1. Resultados de los controles microbiológicos en producto final.

Para evaluar la esterilidad de medicamento, se llevaron a cabo en el producto final una serie de análisis microbiológicos (Tabla 10). La presencia de Mycoplasma en el medio de cultivo se analizó mediante amplificación de ácidos nucleicos (PcR), no detectándose material genético de esta especie en ningún caso. Como test microbiológico rápido se utilizó el Test de Gram urgente que fue negativo en el 100 % de los lotes. Otro método cualitativo microbiológico utilizado fue el sistema BacT/Alert que no alarmó en ningún momento de la presencia de contaminación microbiana. Otro análisis de esterilidad realizado al medicamento fue el nivel de endotoxinas. Este análisis cuantitativo se realizó por el método cinético cromogénico, uno de los métodos recomendados por la Farmacopea (2.6.14 Volumen 8) para la determinación de endotoxinas bacterianas (351). Los niveles de endotoxinas se mantuvieron por debajo de los límites de aceptación (≤ 0.5 UE/ml).

LOTE	MICOPLASMA	BACT-ALERT	GRAM	ENDOTOXINAS
CSM-MO-FUC-V/001	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<0.05
BRC-CSM-MO-FUC-V/001	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<0.02
CSM-MO-FUC-V/002	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0.03
CSM-MO-FUC-V/003	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<0.05

Tabla 10. Resultado de los controles de esterilidad de los lotes de validación.

4.4.2. Resultados de Inmunofenotipo

Los análisis por citometría realizados sobre las 4 muestras tomadas del producto final mostraron un correcto perfil inmunofenotípico de Células Stem Mesenquimales humanas con una elevada expresión de CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de CD45, CD34, D14 y CD20. Los resultados pueden verse en la figura 39. Ya que el aceptador de la fucosa en las CSM-MO es el antígeno de superficie CD44, medimos los niveles del mismo en todos los lotes. Pudimos comprobar que tras la fucosilación se mantenía el fenotipo correspondiente a célula mesenquimal (Figura 39).

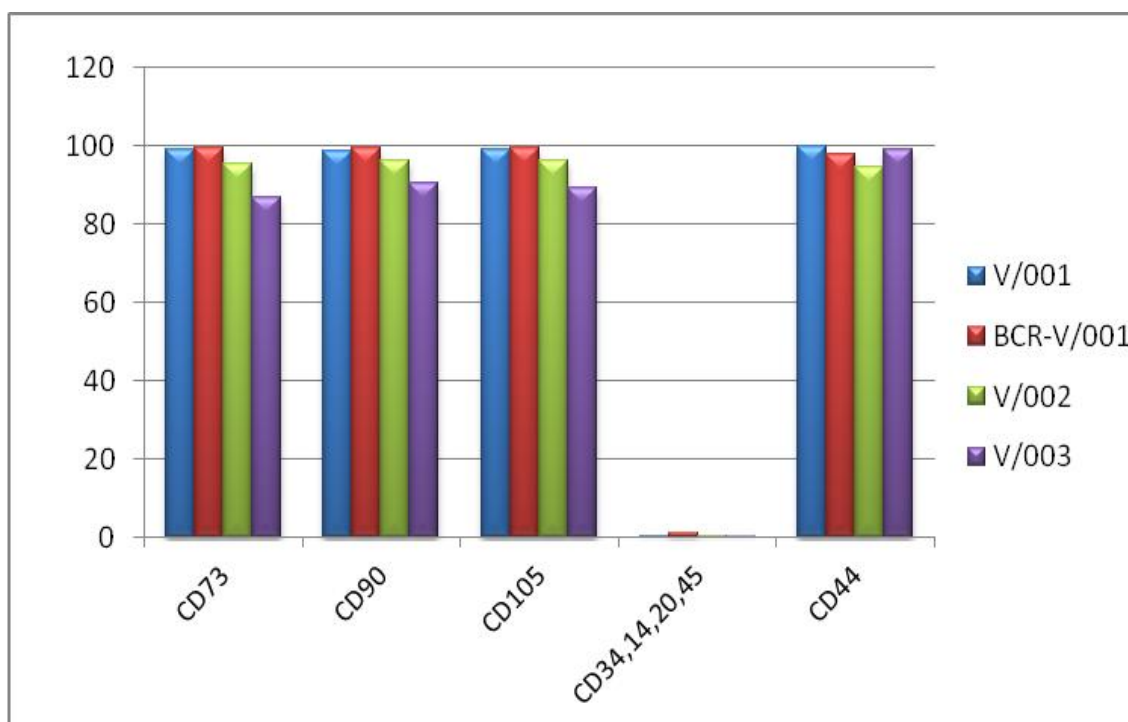


Figura 39. Gráfico Inmunofenotípico de los lotes de validación. Porcentaje de expresión de los marcadores post-fucosilación.

En este punto también incluimos el análisis de la expresión de HCELL utilizando el monoclonal HECA452 con el objetivo de comprobar la especificidad del proceso de fucosilación *in vitro* comparando células fucosiladas y células control de cada uno de los lotes de validación. Para poder tener un control de la eficacia del enzima y de los anticuerpos utilizados, se midió el nivel de expresión de HECA452 en las líneas control RPMI8402 y KG1a (Figura 40).

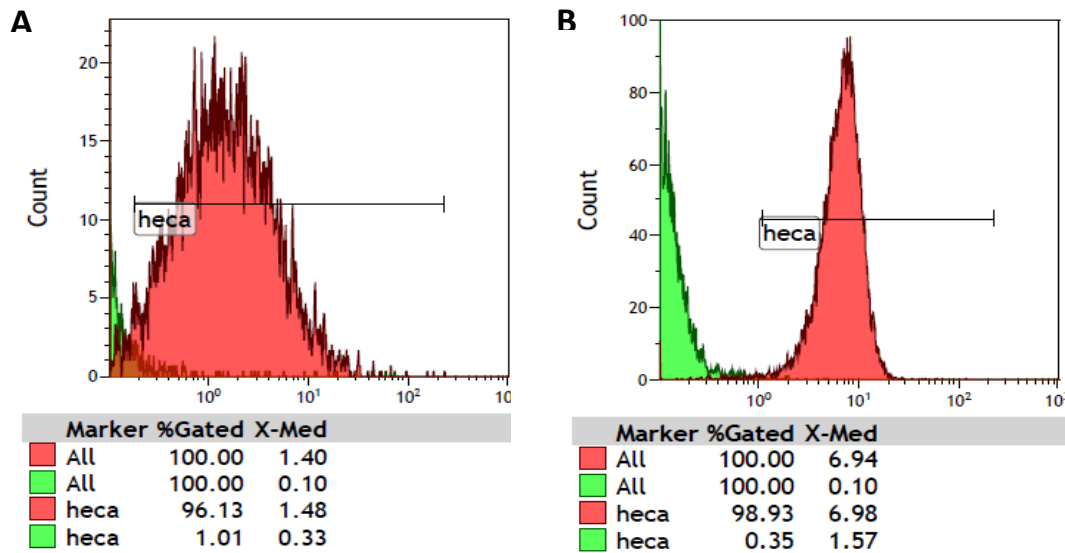


Figura 40. A) Histograma de expresión de HECA452 en KG1a. En verde se muestra el control isotópico. B) Histograma de expresión de HECA452 en la línea RPMI8402. Expresión de HECA452 intensa en células RPMI 8402 fucosiladas (rojo) y baja en las mismas células sin fucosilar (verde).

Tras validar la eficacia de unión de los anticuerpos en las líneas control, se procedió a cuantificar la expresión de HECA452 en las muestras a estudio. Todas las muestras presentaron un patrón de fucosilación adecuado con aumento de expresión de HECA452 (Figura 41, 42, 43, 44 y 45).

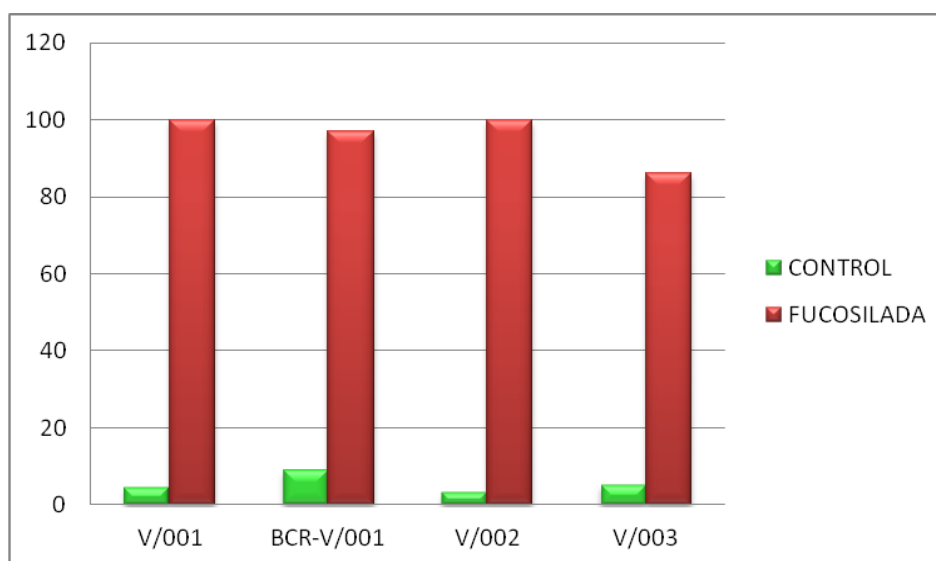


Figura 41. Histograma de expresión de marcadores. Porcentaje de expresión de HECA452 en los distintos lotes de validación. En verde, la expresión de HECA452 en la muestra sin fucosilar y en rojo, el nivel de expresión en la muestra fucosilada.

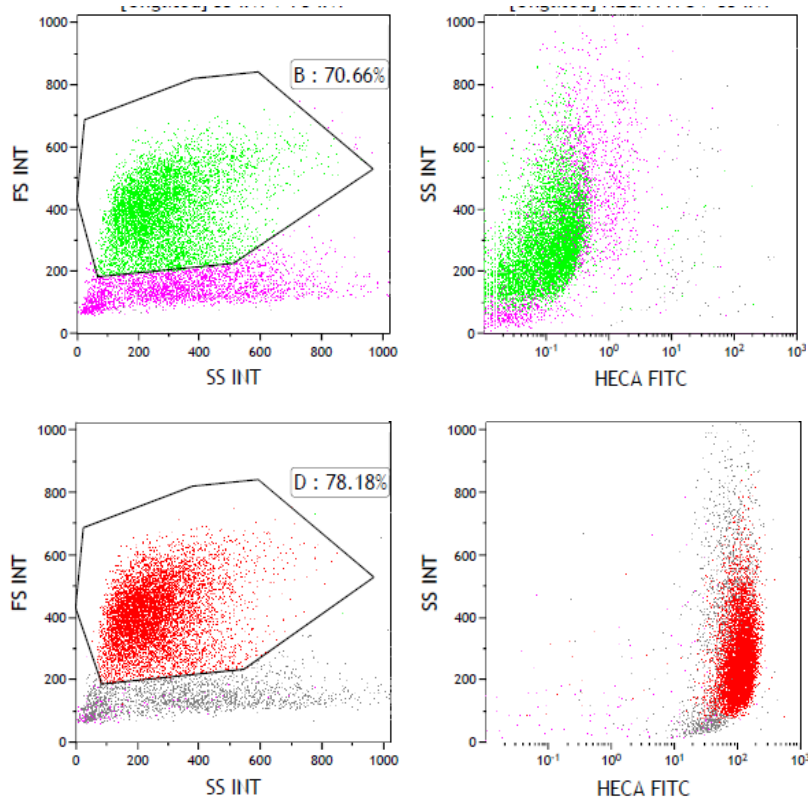


Figura 42. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/001. Expresión de HECA452 intensa en CSM-MO fucosiladas (rojo) y baja en las mismas células sin fucosilar (verde).

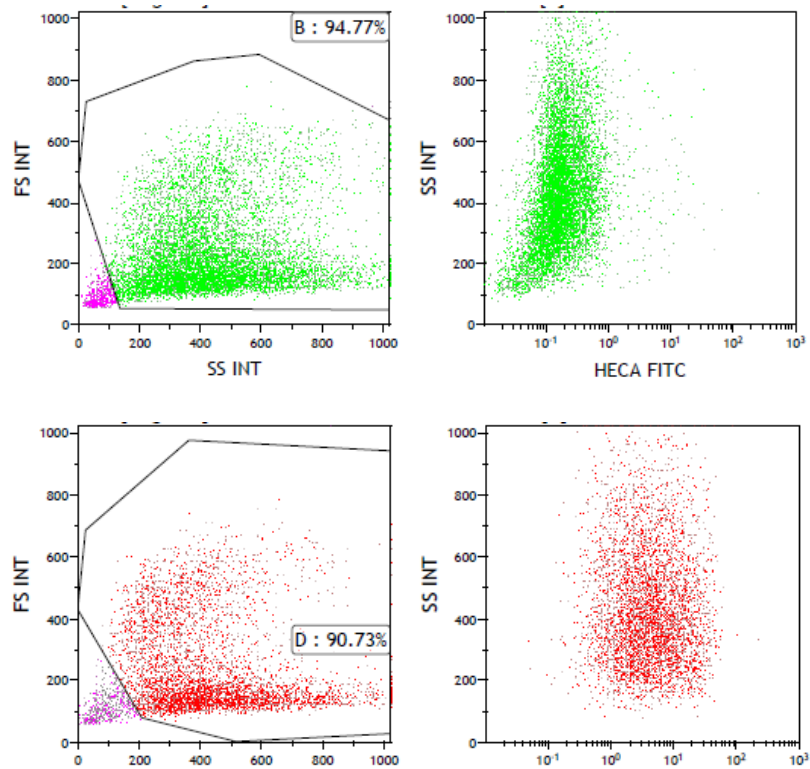


Figura 43. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote BRC-V/001. Expresión de HECA452 intensa en CSM-MO fucosiladas (rojo) y baja en las mismas células sin fucosilar (verde).

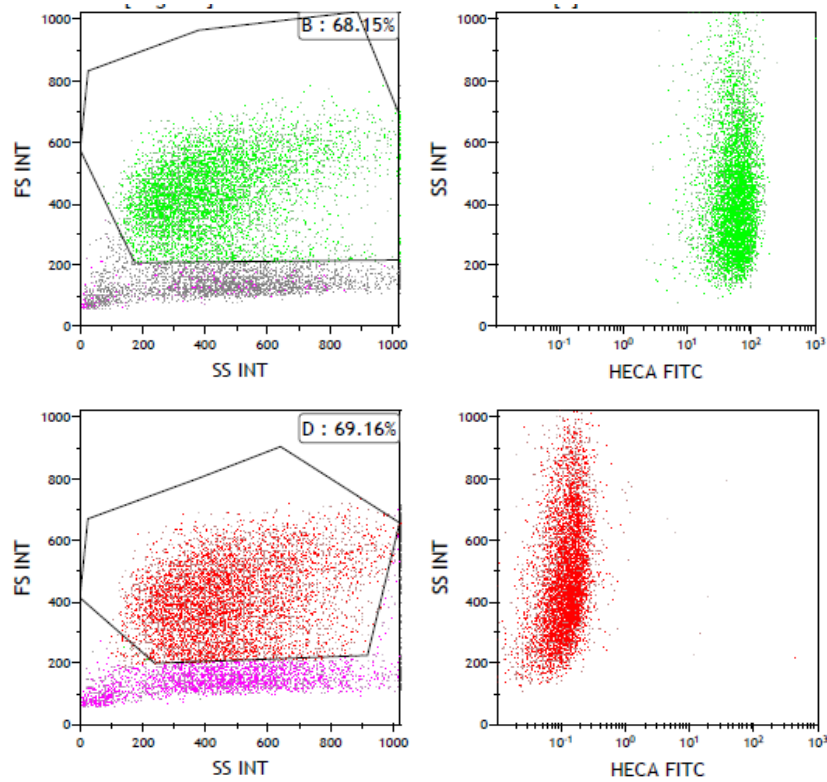


Figura 44. Gráfico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/002. Expresión de HECA452 intensa en CSM-MO fucosiladas (verde) y baja en las mismas células sin fucosilar (rojo).

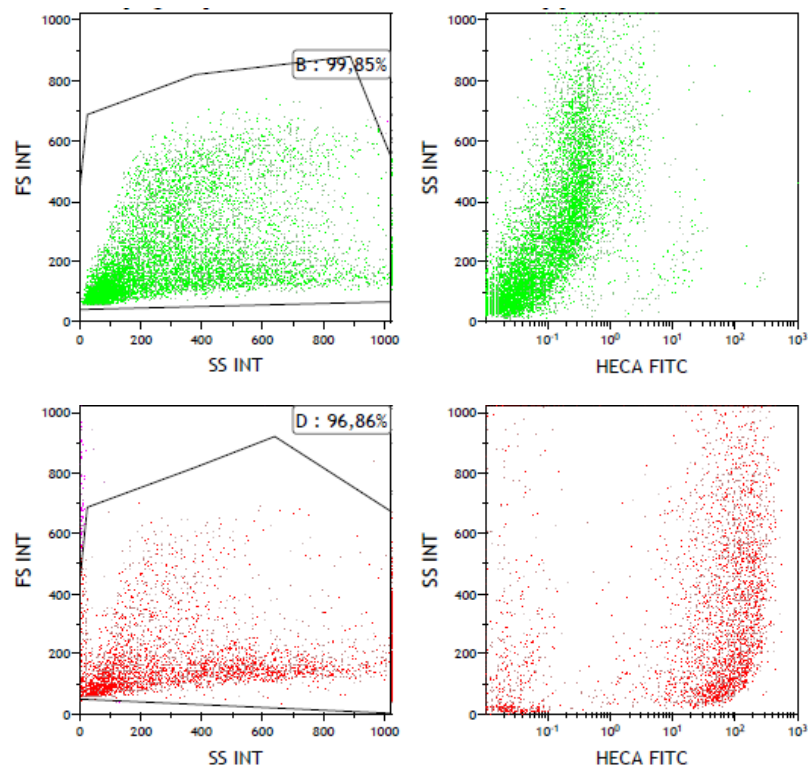


Figura 45. Grafico de puntos biparamétrico que muestra la expresión de HECA452 en el lote V/003. Expresión de HECA452 intensa en CSM-MO fucosiladas (rojo) y baja en las mismas células sin fucosilar (verde).

RESULTADOS

Una vez analizada la expresión de HECA452 en las muestras de los lotes de validación, medimos la unión de estas células fucosiladas al anticuerpo quimérico de E-selectina murina/Fc humano (Figuras 47, 48 y 49) utilizando como control la línea RPMI8402 fucosilada (Figura 46). Tanto los lotes de validación como la línea celular control presentaron unión al anticuerpo quimérico de E-selectina en presencia de Calcio. Los histogramas con las intensidades de expresión se pueden observar en los gráficos que se muestran a continuación (Figuras 46, 47, 48 y 49).

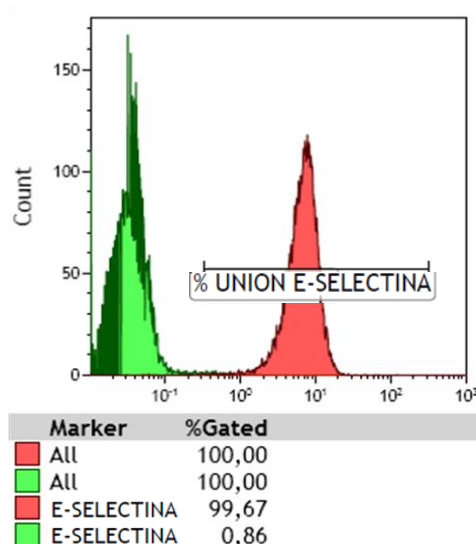


Figura 46. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/Fc humano en la línea RPMI8402. En verde, expresión de la quimera sin tratamiento con FTVII y en rojo, expresión de la quimera tras el tratamiento con FTVII en presencia de calcio.

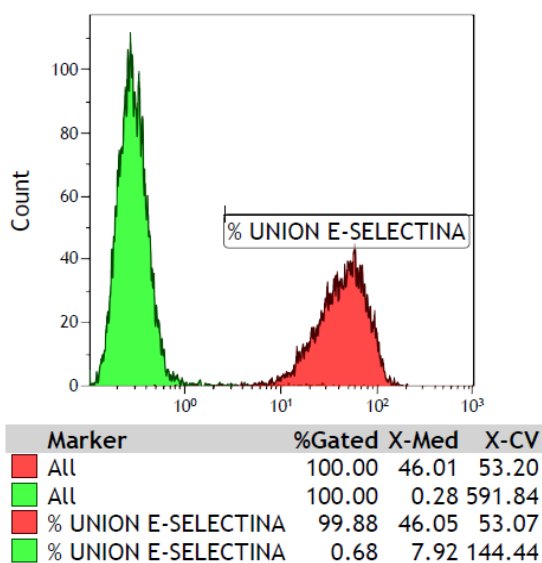


Figura 47. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/001.

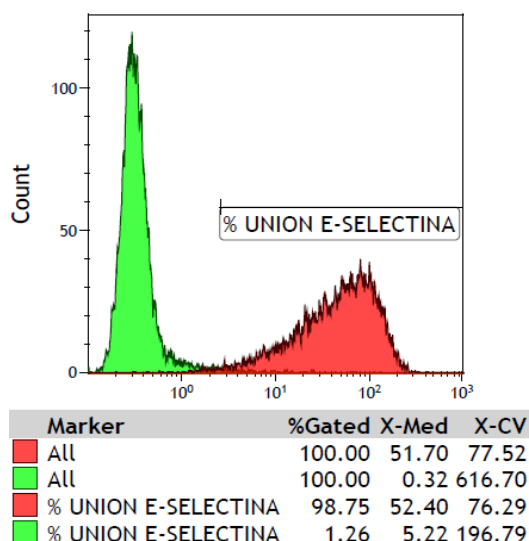


Figura 48. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/002.

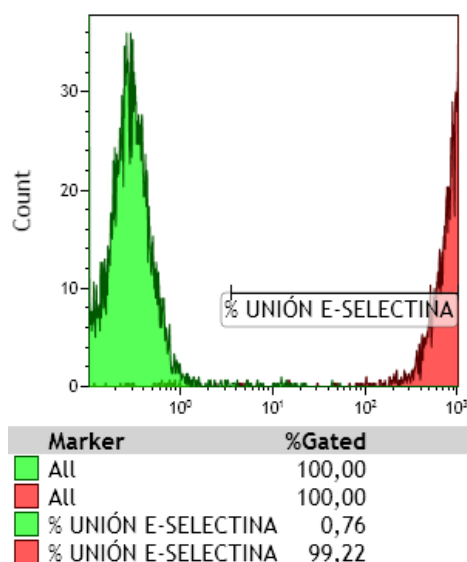


Figura 49. Histograma de expresión de quimera E-selectina murina/ Fc humano sin calcio (verde) y con calcio (rojo) del lote V/003.

4.4.3. Resultados de Viabilidad postfucosilación.

La viabilidad fue estudiada por el método de exclusión con el colorante Azul Tripán y por citometría de flujo con el nivel de expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio. Las cuatro muestras mostraron una viabilidad superior al 75 % con ambas técnicas con una media de 84.75 ± 8.17 con el primer método y $91,07 \pm 2,82$ con el segundo (Tabla 11).

Lote	% Azul Tripan	Anexina V-/IP -
CSM-MO-FUC-V/001	96	92.16
BCR-CSM-MO-FUC-V/001	76	86.99
CSM-MO-FUC-V/002	89	94.76
CSM-MO-FUC-V/003	78	90.37

Tabla 11. Porcentajes de viabilidad de los cuatro lotes de validación con Azul Tripan y Anexina V.

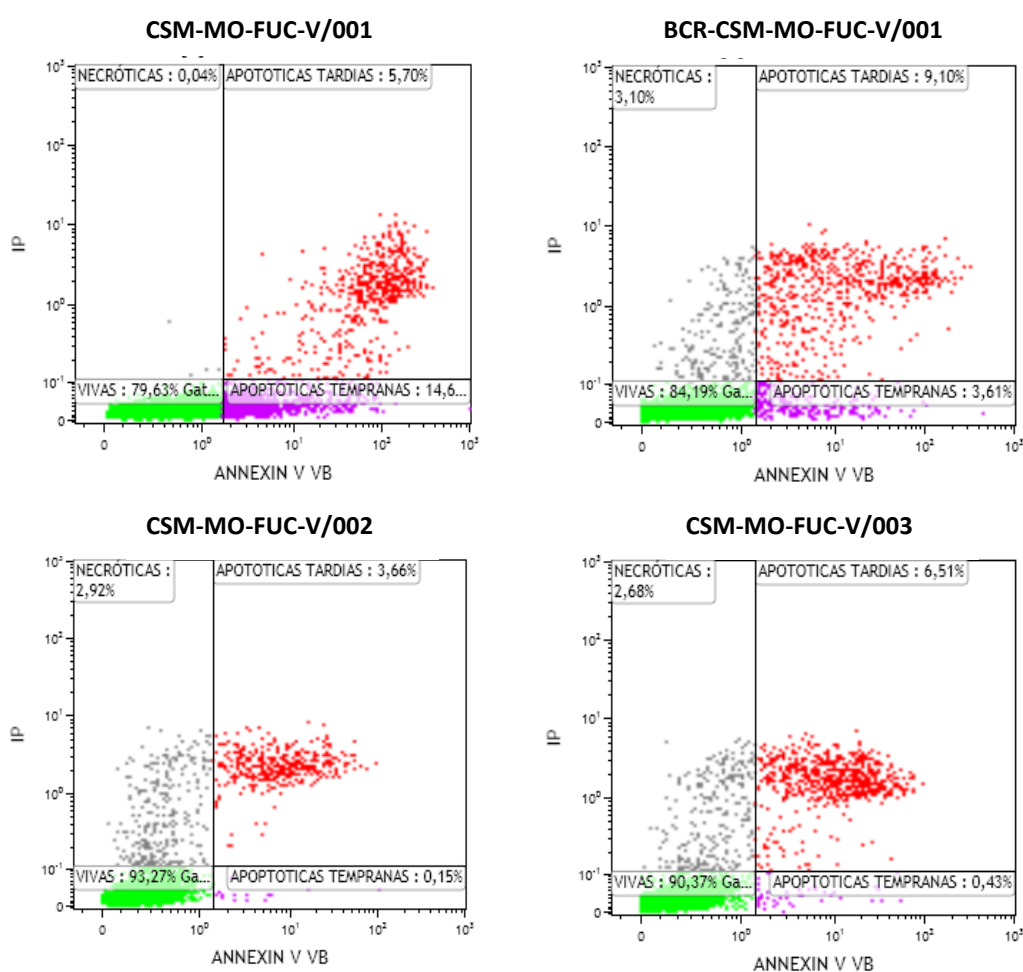


Figura 50. Gráficos de puntos biparamétricos que muestran la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio de los cuatro lotes de validación de CSM-MO expandidas fucosiladas. En verde, las células vivas (Anexina V-/IP-); en gris, las células necróticas (Anexina V-/IP+); en rojo, las células apoptóticas tardías (Anexina V+/IP+) y en morado, las células apoptóticas tempranas (Anexina V+/IP-).

4.4.4. Resultados de los estudios de tumorigénesis.

4.4.4.1. CARIOTIPO

Para demostrar que el método de expansión celular mantenía la estabilidad genómica durante el periodo de cultivo *in vitro*, se llevó a cabo un análisis del cariotipo. Las 4 muestras estudiadas presentaron un cariotipo normal en fase previo a la exofucosilación enzimática. En la Figura 51 se expone un ejemplo representativo del cariotipo de la del lote CSM-MOFUC-V/001 en fase 2.

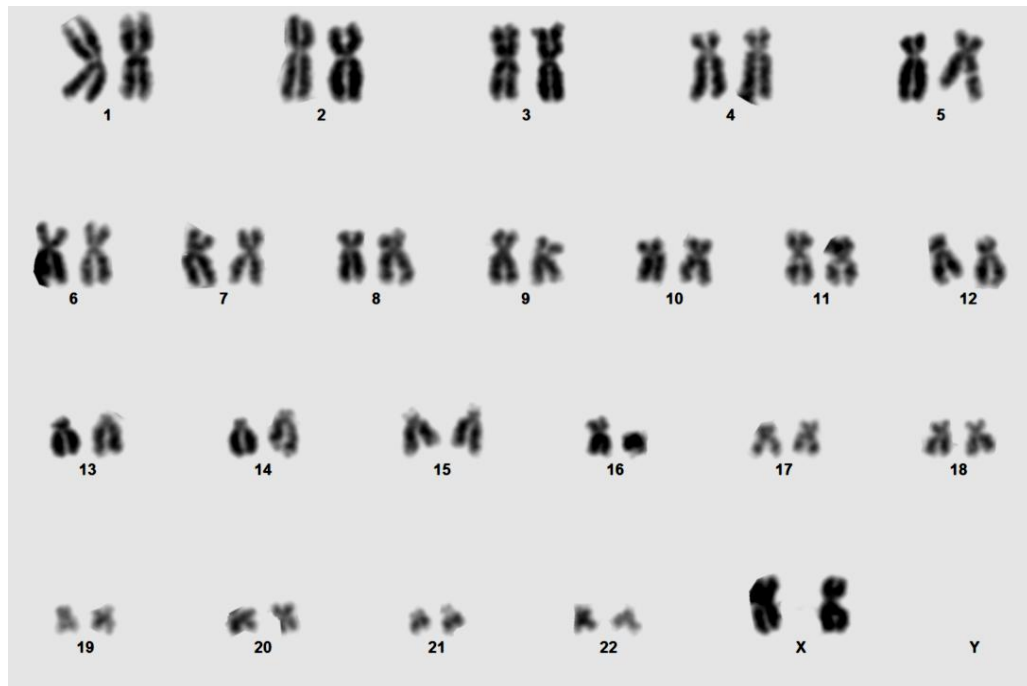


Figura 51. Cariotipo en fase 2 del lote CSM-MOFUC-V/001.

4.4.4.2. C-MYC.

C-myc es un protooncogen cuyos productos están involucrados directamente en el desarrollo de tumores por lo que se incluyó el nivel de expresión de C-myc como un indicador de tumorigénesis en el producto final analizando su nivel mediante PcRq en una muestra de cada lote de validación.

Los resultados obtenidos para las 4 muestras fueron 1.15, 1.00, 1.18 y 0.49, lo que se puede interpretar como que las células mesenquimales tenían niveles bajos de expresión de c-myc, similares a los de la línea celular usada como control negativo, DG-75, dándose igualdad en una de las muestras (BCR-CSM-MOFUC-V/001) y estando incluso por debajo del control negativo en otra (CSM-MOFUC-V/003). Estos datos sugieren que los 4 lotes de validación poseen bajos niveles de tumorigenicidad.

Muestra	Valor de C-myc
DG75 (Referencia)	1,00
Namalwa (Ctrl Positivo)	4,82
CSM-MO OSP-V/001	1,15
BCR-CSM-MO OSP-V/001	1,00
CSM-MO OSP-V/002	1,18
CSM-MO OSP-V/003	0,49

Tabla 12. Niveles de expresión de C-myc de los cuatro lotes de validación.

4.4.5. Resultados de Diferenciación.

Para demostrar la capacidad de diferenciación multilineal de las CSM fucosiladas, se indujo su diferenciación hacia osteoblasto, adipocito y condrocito, de acuerdo con lo descrito en Material y Métodos. En todos los casos se obtuvo diferenciación hacia los tres tipos celulares mencionados. El 100% de los cultivos de las CSM-MO fucosiladas mostró una correcta diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

El 100% de los cultivos de CSM en medio NH Osteodiff Médium que habían sido sometidas al proceso de fucosilación mostraron expresión de fosfatasa alcalina. En la Figura 52 se muestra un ejemplo representativo de células de color púrpura oscuro (B) tras aplicar solución NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, mientras que en el control negativo (A) no se observó. También se observaron depósitos de calcio de color naranja tras añadir Alizarín Red (Figura 53, A) y en menor proporción en el control (Figura 53, B).

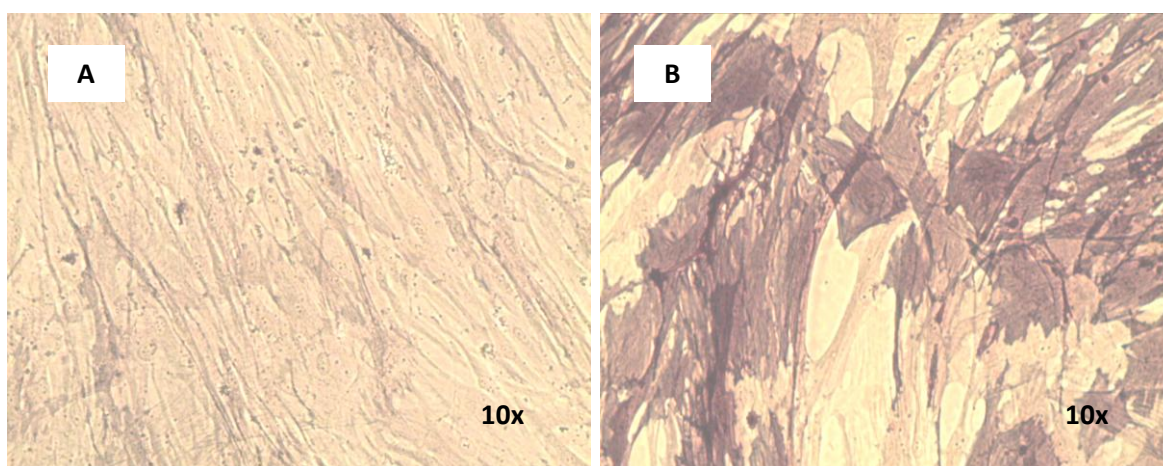


Figura 52. Evaluación de la diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar NBT/BCIP en uno de los lotes de validación. CSM-MO fucosiladas cultivadas en medio DMEM como control negativo (A) y CSM fucosiladas cultivadas en medio de diferenciación Osteodiff (B).

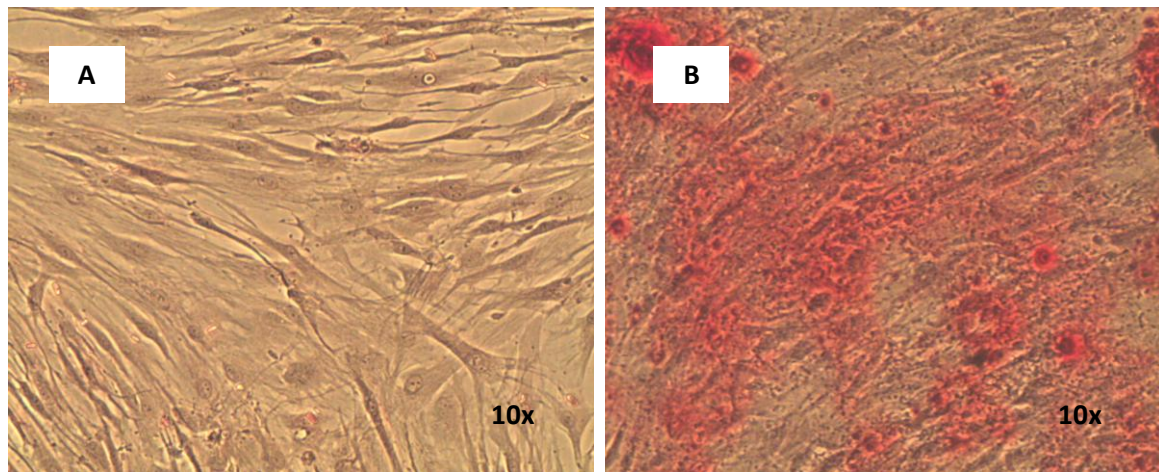


Figura 53. Evaluación de la diferenciación osteogénica en CSM tras aplicar Alizarin Red en uno de los lotes de validación. CSM fucosiladas en medio DMEM utilizadas como control negativo (A) y CSM fucosiladas en medio Osteodiff (B).

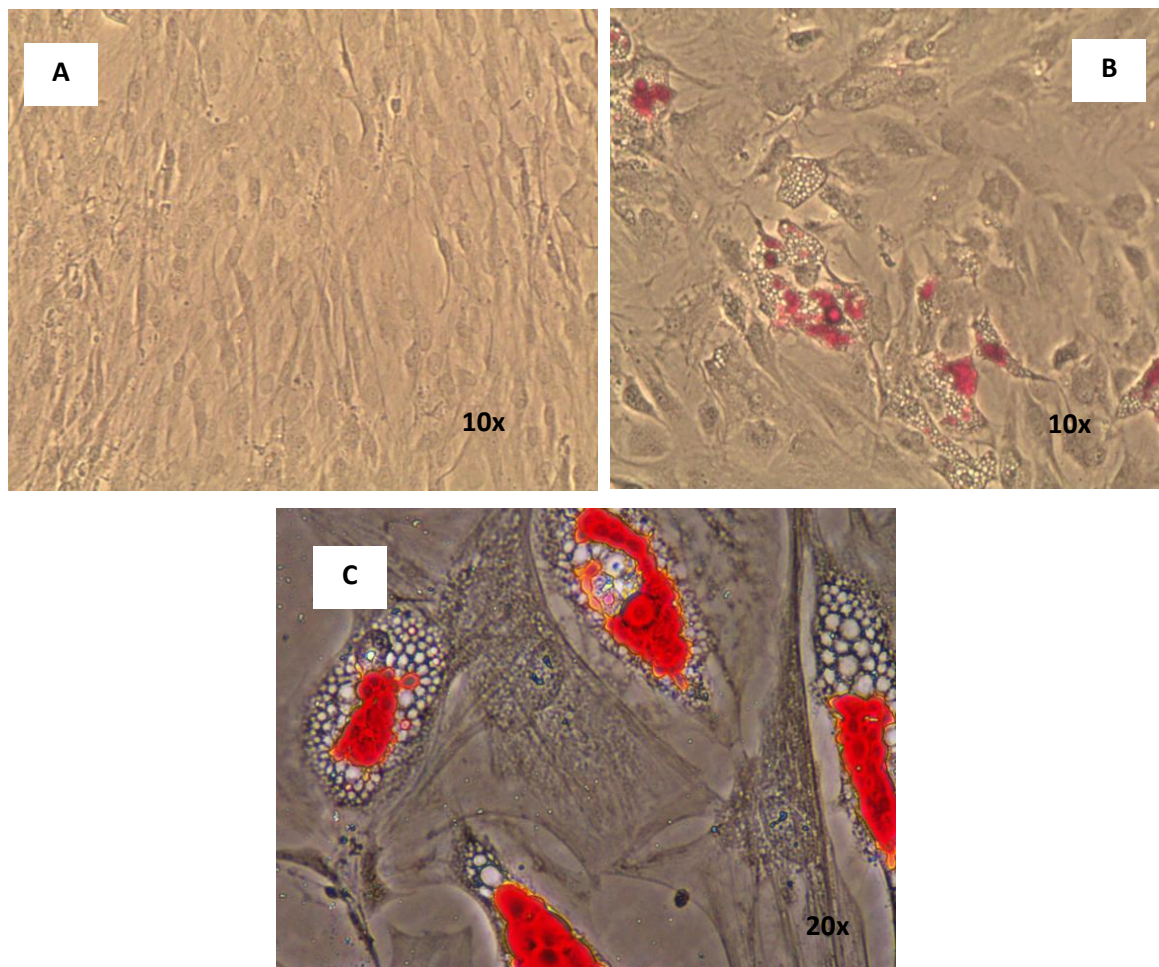


Figura 54. Evaluación de la diferenciación adipogénica en CSM tras aplicar Oil Red en uno de los lotes de validación. CSM fucosiladas en medio DMEM normal utilizadas como control negativo (A) y CSM fucosiladas en medio Adipodiff (B). En la imagen de abajo (C) puede observarse con más aumentos la célula con vacuolas citoplasmáticas lipídicas teñidas de rojo.

RESULTADOS

Un 100% de las CSM humanas fucosiladas sometidas a cultivos de diferenciación en medio NH Adipodiff Médium mostraron vacuolas lipídicas citoplasmáticas tras añadir Oil Red (color rojo) lo que confirma una capacidad de diferenciación adipogénica tras el proceso de fucosilación. En los controles negativos no se observaron vacuolas de grasas en el citoplasma (Figura 54).

El 100% de los cultivos de CSM en medio NH ChondroDiff que habían sido sometidas al proceso de fucosilación mostraron una correcta diferenciación condrogénica identificándose condrocitos con la tinción Azul Alcian (Figura 55). Con esta tinción pudimos constatar la presencia de proteoglicanos teñidos de color azul. En los controles negativos no se observó diferenciación condrogénica

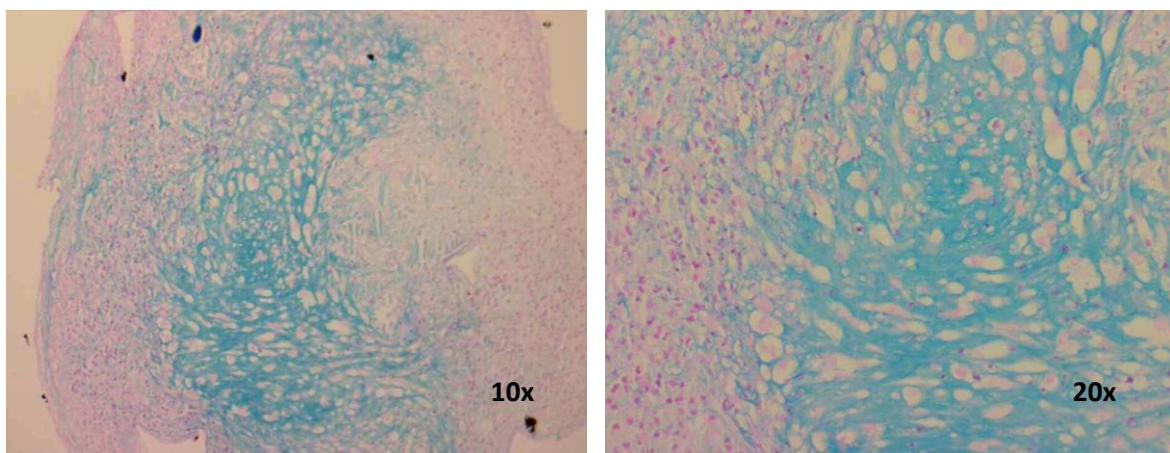


Figura 55. Condrocitos tras cultivo de CSM fucosiladas en medio NH Chondrodiff (Azul Alcian).

4.4.6. Resultados de estabilidad.

El objetivo de este análisis fue testar la estabilidad de las CSM-MOFUC en términos de viabilidad e inmunofenotipo teniendo en cuenta la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Las muestras de tres lotes distintos se almacenaron a 4°C y se tomaron muestras para su análisis a las 0, 24 y 48 horas. La viabilidad se midió como porcentaje de células Anexina V-/IP- (Figura 57) y la expresión de HCELL como HECA452+ (Figura 58).

El análisis inmunofenotípico, llevado a cabo como se detalla en el punto 5.5 de Material y Métodos, siguiendo las directrices marcadas por la ISCT, reveló un fenotipo mesenquimal normal en los lotes analizados comparando la muestra basal y las recogidas a 24 y 48 horas. Los marcadores tanto positivos como negativos se mantuvieron en todo momento dentro de los rangos exigidos de positividad mayor del 95 % en CD73, CD90 y CD105 (Figura 56) y negatividad de marcadores CD45, CD34, CD14 y HLA-DR menor del 5% como muestra la siguiente tabla. A pesar de cumplir con los porcentajes de la ISCT, se observó una ligera bajada en la expresión de CD90, CD73 y CD105 en las muestras de 2 y 3 a las 24 y 48 horas.

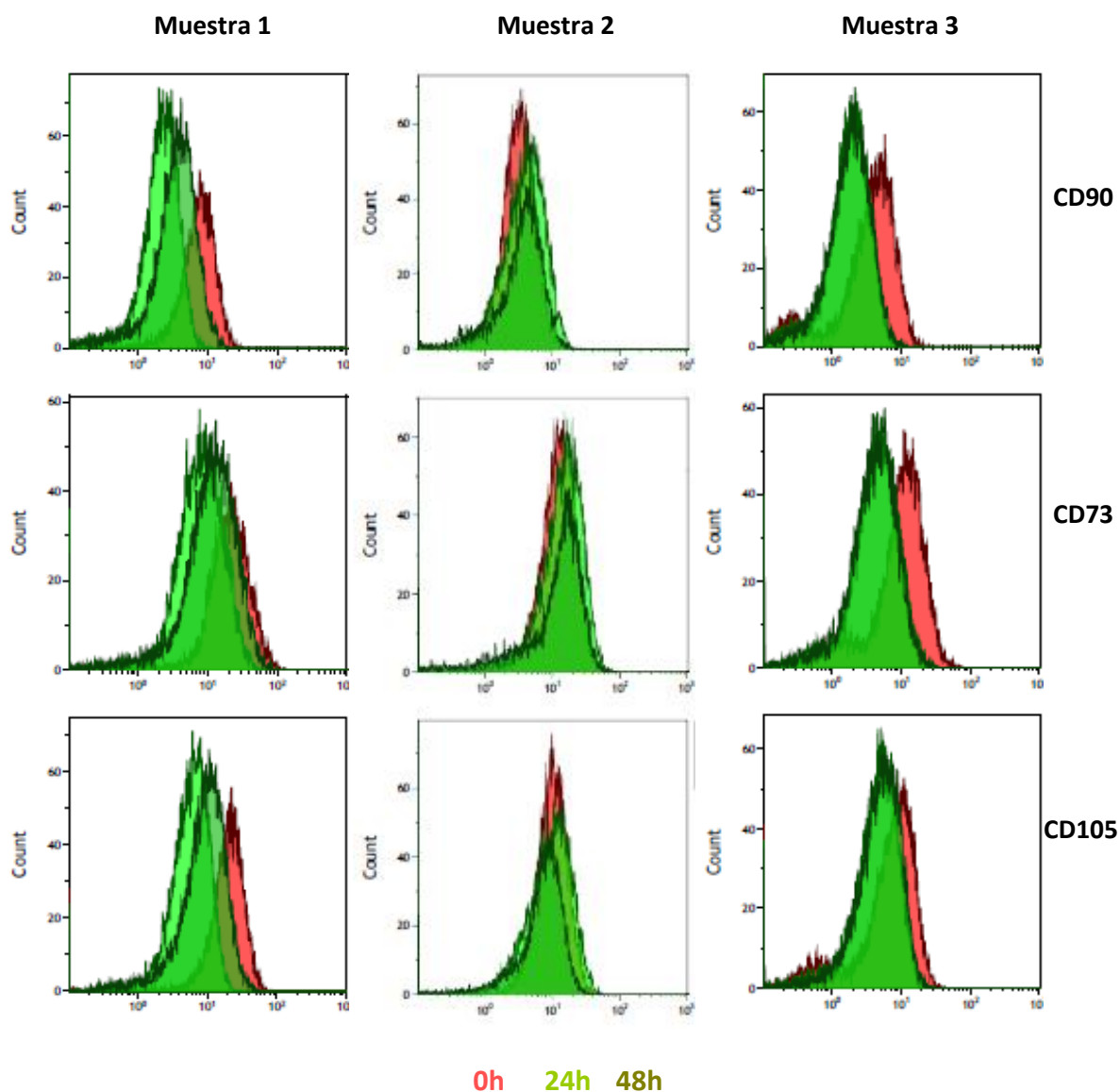


Figura 56. Histograma de expresión de marcadores positivos de identidad mesenquimal CD90 (fila de arriba), CD73 (fila del centro) y CD105 (fila de abajo) medidos en tres muestras distintas de células troncales mesenquimales de médula ósea expandidas y fucosiladas con FTVII según protocolo normalizado a las 0 horas (rojo), 24 horas (verde claro) y 48 horas (verde oscuro) de su producción.

Los resultados de viabilidad (expresión Anexina V-/IP-) de las tres muestras incluidas en este estudio se muestran en la Figura 57, estando por encima del 88% en todas las muestras analizadas. Estos datos indican que la viabilidad de las CSM-MOFUC humanas se mantiene estable tanto a las 24 como a las 48 horas de su producción y almacenamiento a 4°C.

La expresión de HECA452 también mantuvo altos niveles de positividad y por tanto cumplimiento de la especificación establecida para este producto (expresión de HECA452 \geq 80%) durante el estudio en todas las muestras estudiadas. Únicamente la viabilidad de la muestra 1, como puede apreciarse en la Figura 58, descendió a 79,9% a las 48 horas de haber sido fucosiladas, saliéndose de especificación tan sólo por 0,1 punto de expresión del marcador.

RESULTADOS

Estos datos confirman el mantenimiento del fenotipo fucosilado al menos durante 24 horas y almacenamiento a 4°C.

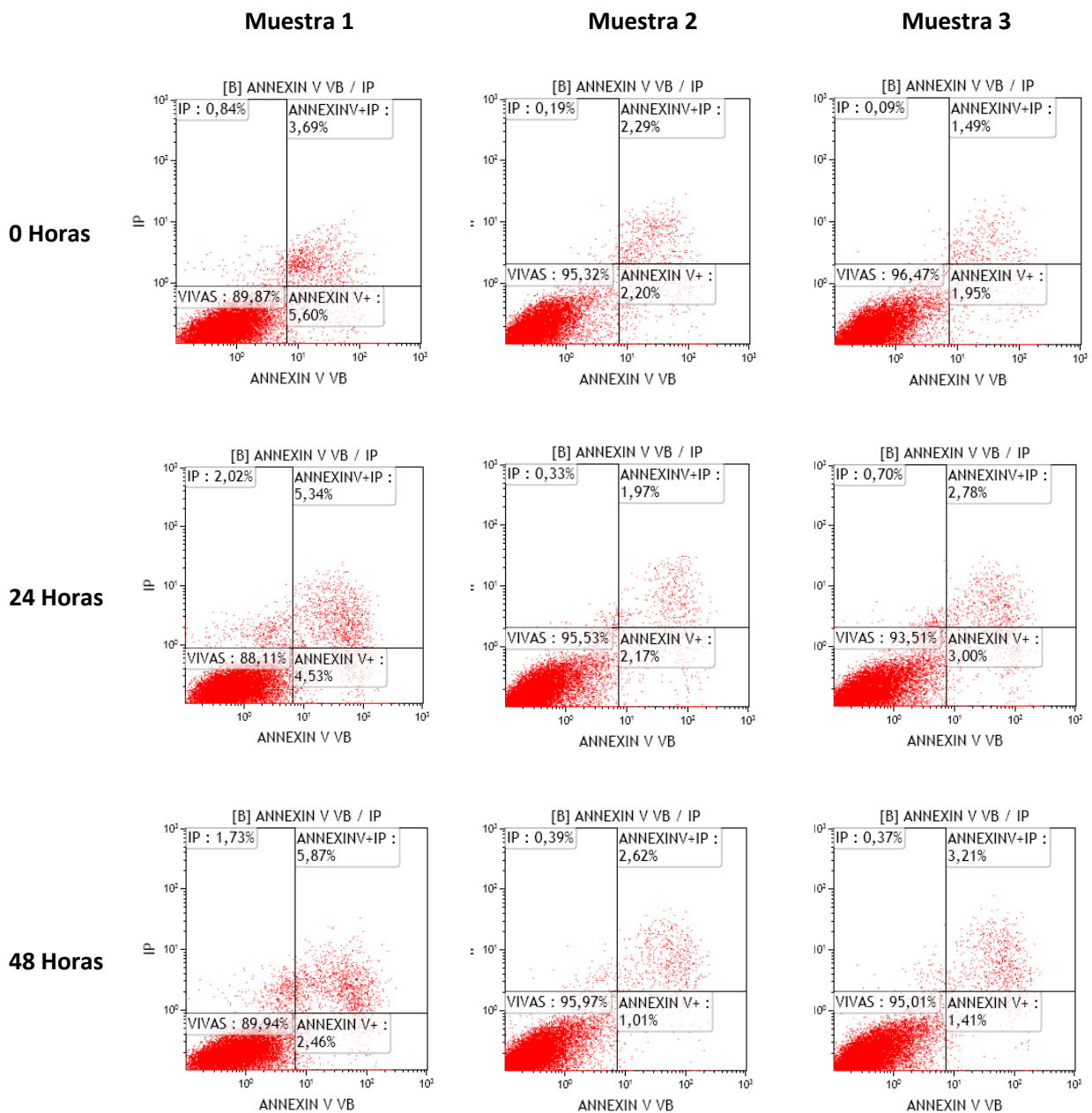


Figura 57. Gráficos de puntos biparamétricos que muestran la expresión de Anexina V y Ioduro de Propidio de tres lotes distintos de células troncales mesenquimales de médula ósea expandidas y fucosiladas según protocolo normalizado a las 0 horas (fila de arriba), 24 horas (fila de central) y 48 horas (fila de abajo). Las células vivas se sitúan en cada *plot* en el cuadrante inferior izquierdo coincidiendo con la negatividad simultánea a ambos marcadores, Anexina V y Ioduro de Propidio.

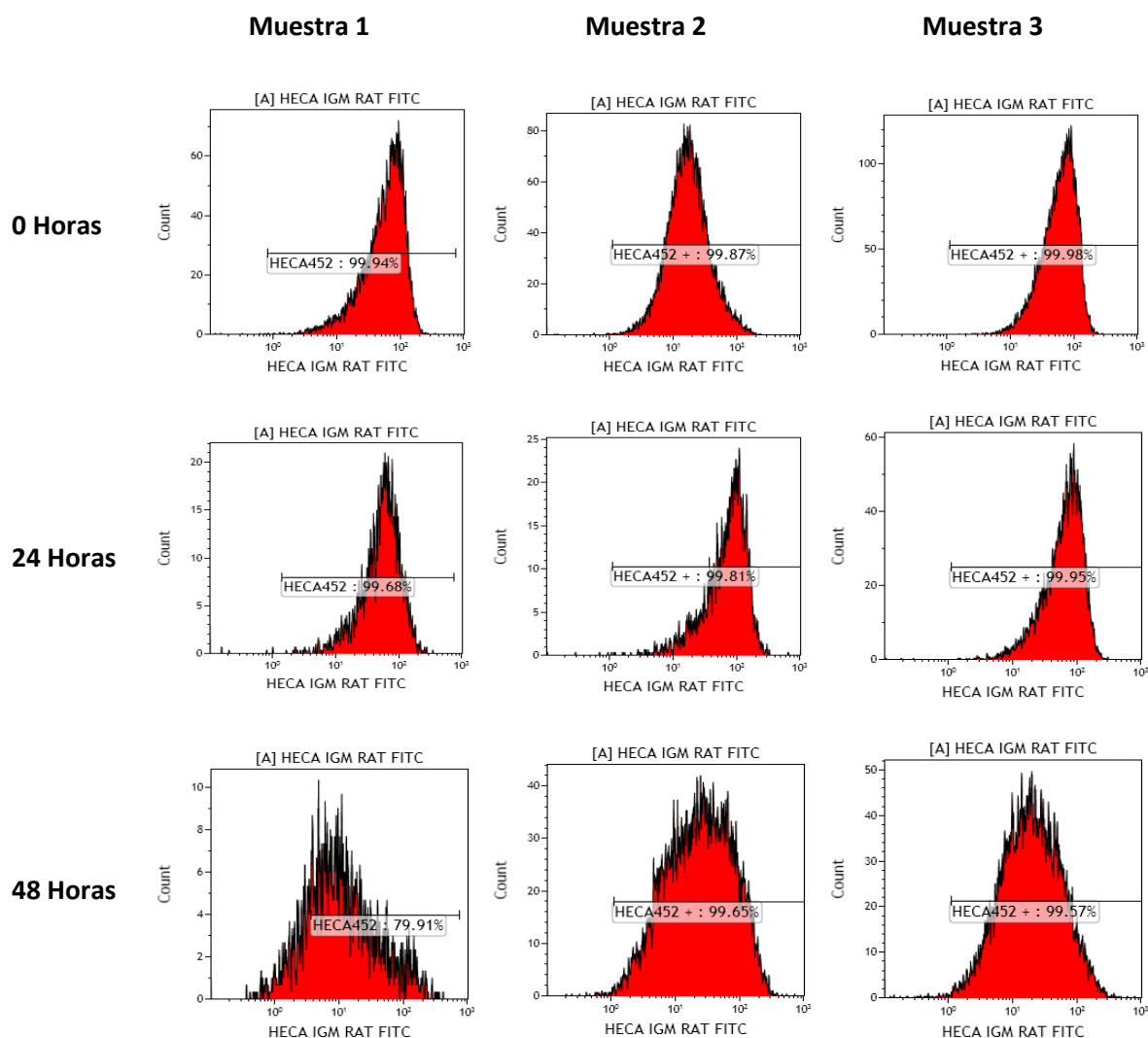


Figura 58. Histograma de expresión de HECA452 en las muestras de tres lotes distintos de CSM-MOFUC sometidos al estudio de estabilidad a las 0, 24 y 48 horas.

Es importante destacar que la expresión forzada de HCELL en la superficie celular es transitoria, con reversión al fenotipo CD44 endógeno en las 48 horas posteriores a la fucosilación (244).

Las guías, registros e informes de las tres validaciones del proceso de producción se archivaron en los expedientes de lote correspondientes, enviándose el protocolo de validación del proceso y el informe con los resultados de dicha validación a la AEMPS junto con la solicitud de ampliación del ámbito del certificado GMP de la UPC para la inclusión del medicamento “Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas”.

DISCUSIÓN

En los últimos años las células madre mesenquimales se han empleado ampliamente como medicamento de terapia celular. Desde 2011, hay registrados más de 200 ensayos clínicos utilizando estas células (<http://www.clinicaltrials.gov/>) en una amplia gama de patologías, la mayor parte en el contexto de ensayos clínicos Fase I, Fase II o Fase I/II (398).

De los resultados publicados hasta la fecha podemos extraer principalmente conclusiones tranquilizadoras con respecto a su seguridad, ya que la mayoría de los ensayos informaron de ausencia de efectos adversos y pocos mostraron efectos leves y pasajeros peri-infusión. En cuanto al aspecto de eficacia, se han obtenido resultados muy prometedores con la infusión intravenosa de MSC autólogas y alogénicas en pacientes con osteogénesis imperfecta, enfermedad injerto contra huésped refractaria, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide y otras patologías.

Sin embargo, uno de los factores que podría estar limitando la obtención de resultados clínicos contundentes en el caso de terapias con administración intravenosa de CSM sería el que finalmente sean pocas las células que alcanzan el tejido diana donde deben ejercer su acción.

La exo-fucosilación de las CSM, según lo publicado por el Dr. Sackstein y su equipo aumenta el tropismo de estas células por lugares con expresión de E-selectina como el endotelio de los capilares de la médula ósea o tejidos inflamados, etc. lo cual constituye una herramienta enormemente prometedora que dirigiría a las células a su lugar de acción en el tratamiento de patologías sistémicas como la osteoporosis (381,396).

Para poder trasladar el conocimiento básico generado por el Dr. Sackstein al ámbito clínico, era necesario que la autoridad competente (en nuestro caso la Agencia Española del Medicamento) nos autorizase como Unidad de Producción Celular para la fabricación del medicamento “Células mesenquimales troncales adultas de médula ósea autólogas expandidas y fucosiladas” como Producto en Investigación (PEI) y vincularlo al desarrollo de un ensayo clínico (399–401).

En concreto el “Ensayo clínico en fase I prospectivo, unicéntrico, abierto, no aleatorizado, para evaluar la infusión intravenosa de células mesenquimales de médula ósea autólogas fucosiladas como terapia en pacientes con Osteoporosis establecida con fractura de bajo impacto” (CSM/OP/2011) coordinado por el Servicio de Reumatología del HCUVA (Dr. Luis Linares Ferrando) fue autorizado por la AEMPS en Noviembre de 2014.

Con este fin elaboramos un *dossier* del Producto en Investigación en el cual detallamos minuciosamente el proceso de producción del medicamento de terapia celular: material de partida, controles de calidad y microbiológicos (en el producto inicial, intermedio y final) y especificaciones del producto final. En él aportamos toda la información disponible (propia y bibliográfica) sobre la farmacología del mismo: distribución, farmacocinética, toxicidad, así como la justificación de su utilidad en la indicación solicitada, apoyada en los estudios preclínicos y/o clínicos existentes (402). Parte de esta información de fabricación la obtuvimos tras fucosilar con éxito células mesenquimales expandidas sin reactivos de origen animal y tras realizar un estudio preclínico para evaluar la seguridad y eficacia de dichas células infundidas en ratones inmunode-

primidos, cuyos resultados favorables se recogen en la Tesis Doctoral defendida por el Dr. Cabañas Perianes (393).

Una vez elaborado el *dossier* había que realizar los ensayos de validación del mismo en las instalaciones de la Unidad de Producción celular, incluyendo la validación del proceso aséptico y la validación del proceso de producción del medicamento. Para obtener una validación aceptable era necesario conseguir al menos 3 resultados favorables consecutivos (314).

El objetivo global del presente trabajo fue validar el protocolo de expansión y fucosilación de CSM de MO humanas a escala clínica descrito en el dossier del PEI “Células mesenquimales troncales adultas de médula ósea autólogas expandidas y fucosiladas” de acuerdo a los estándares de calidad exigidos por las Normas de Correcta Fabricación.

Nuestro primer objetivo fue comprobar la factibilidad de la fucosilación de células mesenquimales de médula ósea humana expandidas con lisado plaquetario y TrypLE Select.

En los experimentos publicados por el Dr. Robert Sackstein, los cultivos y la fucosilación de mesenquimales humanas de médula ósea se realizaron a pequeña escala y utilizando suero bovino fetal y tripsina durante la expansión. Cuando se trasladan protocolos básicos a producción a gran escala se requiere introducir ciertos cambios en el proceso como la siembra a menor densidad o los pases a mayor confluencia para poder conseguir un número mayor de células. Además, la obtención de suficiente número de células mesenquimales, principalmente cuando la fuente de la que se parte es un tejido adulto, requiere su expansión *in vitro* durante varios pases. Tradicionalmente se han empleado medios de cultivo suplementados con suero bovino fetal con o sin adición de otros factores de crecimiento. Sin embargo de cara a la traslación clínica, los productos xenogénicos como el suero bovino fetal no se consideran elementos idóneos en la cadena de producción, por ser una potencial fuente de transmisión de enfermedades por virus o priones, reacciones inmunológicas asociadas a su carga de proteínas de origen animal o incluso a la producción de anticuerpos anti-SBF sobre todo tras exposiciones repetidas (403,404).

Las agencias reguladoras aceptan el uso de SBF para la producción de medicamentos de terapia avanzada para uso humano dada la escasez de alternativas, pero en la Guía de normas para minimizar el riesgo de transmisión de agentes causantes de encefalopatía espongiiforme a través de medicamentos o productos sanitarios de uso humano de la EMA (405) establecen exhaustivos controles para los derivados de sangre bovina entre los que se encuentra el suero bovino fetal usado en cultivo celular. Los restrictivos criterios de calidad que aplican a todo el proceso de fabricación y que van desde la procedencia geográfica, edad de los animales, métodos de obtención de la sangre de partida, fabricación, controles de calidad, trazabilidad, etc. lo convierten en un producto de elevado coste económico. Si tenemos en cuenta que la recomendación es adquirir un lote único que cubra todas las producciones para un ensayo clínico evitando así la variabilidad lote a lote, el gasto puede ser en ocasiones inasumible para unidades de producción pequeñas.

Si a todo esto sumamos los problemas éticos derivados de aspectos relacionados con el bienestar animal, es entendible el interés por buscar alternativas para la suplementación de los medios de cultivo, siendo actualmente la más extendida el uso de lisado plaquetario (LP).

Comparado con SBF, el LP mejora la capacidad proliferativa de las CSM ahorrando tiempo en la expansión. Además intensifica su potencial de diferenciación osteogénica (321,353,406,407). Estas propiedades, nos resultaban muy interesantes en relación al ensayo clínico vinculado a nuestro PEI en el que las células mesenquimales van a proceder de pacientes osteoporóticas y de edad avanzada, en las que se ha descrito menor capacidad proliferativa y una mayor tendencia a la diferenciación adipogénica (408).

En nuestro caso, dos de las médulas óseas de partida para validación correspondieron a dos pacientes osteoporóticas de 64 y 74 años (V/002 y V/003). Durante el proceso de expansión de estas muestras con medio suplementado con lisado plaquetario alcanzamos dosis de $>100 \times 10^6$ CSM tras sólo 2 y 3 pases en cultivo respectivamente.

Asimismo, como se ha expuesto en el apartado de resultados, todos los lotes de validación presentaron una adecuada diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica, sin embargo este dato se evaluó únicamente de manera cualitativa.

El LP contiene multitud de componentes entre los que se encuentran enzimas como la neuraminidasa, que nos hizo plantearnos la posibilidad de que la fucosilación de células tratadas con LP no fuese eficaz si esta enzima presente en el medio de cultivo escindía el ácido siálico de la molécula de CD44 presente en la superficie de las CSM. Nuestros resultados demuestran que no hubo interferencia para la fucosilación en ninguna de las muestras evaluadas en Boston ni en los ensayos de validación llevados a cabo en la UPC.

El TrypLE Select es una proteasa de origen recombinante (no contiene derivados humanos ni animales) apta para su uso en GMP. Es estable a temperatura ambiente lo que simplifica el manejo y requerimientos en cuanto a condiciones de almacenamiento y controles de calidad si lo comparamos con la tripsina porcina que se ha de mantener congelada a -20°C . Su tiempo de actuación es más rápido que el de la tripsina y no tiene efectos adversos sobre la viabilidad celular, no siendo necesaria su neutralización. Todo ello permite abaratar costes ya que las incubaciones son más cortas y se limita el gasto de medio completo como neutralizador de la reacción. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento enzimático con TripLE Select para disociar las células mesenquimales y despegarlas de la superficie de cultivo no afecta a que posteriormente se fucosilen de forma eficaz.

La especificidad de la técnica de fucosilación la comprobamos mediante la expresión de HCELL por medio de citometría de flujo. Para ello utilizamos un anticuerpo monoclonal que reacciona con el tetrasacárido sLe^x, conocido como HECA452 (232) en las muestras de CSM que habían sido tratadas con la enzima fucosiltransferasa FTVI. Para validar la eficacia de la reacción enzimática se usaron dos líneas celulares control: KG1a, que expresa de manera constitutiva la estructura HCELL y reacciona con el anticuerpo HECA 452 y RPMI8402 que posee residuos de

lactosamina sializados susceptibles de fucosilación y por tanto formación de HCELL y detección con HECA452. Una vez que comprobada la actividad de la enzima FTVI y la afinidad del monoclonal HECA452 por el nuevo constructo mediante citometría de flujo, se analizó el nivel de expresión en las células cultivadas en Medio 1 (con SBF y Tripsina porcina) y Medio 2 (con LP y Tryple Select). Las CSM-MO expandidas con ambos medios expresaron altos niveles de HECA452 por citometría de flujo. Ambas células fueron positivas tras fucosilación para el anticuerpo HECA452. Para mayor consistencia, realizamos controles negativos con las muestras de CSM no sometidas al proceso de fucosilación y observamos un nivel de expresión de HECA452 muy bajo y equiparable al control isotópico.

Por Western-Blot se analizó el andamiaje proteico sobre el que había tenido lugar la adición de fucosa. Las bandas observadas tras la inmunodetección revelaron que HCELL se había formado mediante fucosilación de CD44 sializado (90-100 KDa) presente en las CSM objetivándose que estas bandas aparecían tanto en CSM cultivadas con SBF como con LP. Además el peso molecular de esta glicofoma de CD44 se corresponde con la forma hematopoyética expresada por células de origen mesodérmico (409).

Finalmente, con el fin de estudiar la funcionalidad del receptor fucosilado, se llevó a cabo un ensayo de adherencia de linfocitos de sangre periférica a las CSM-MO expandidas con LP y tratadas con FTVI. Con este experimento se pudo confirmar por microscopia óptica que el efecto de la fucosilación aumentaba la tasa de adhesión a linfocitos de sangre periférica en presencia de calcio y con dinámica de flujo en las CSM fucosiladas que se habían cultivado en presencia de LP.

Otros grupos han conseguido realizar con eficiencia el proceso de fucosilación *in vitro*, y emplean otras fucosiltransferasas o productos como el manganeso que son tóxicos *in vivo*, lo que les invalida para las pruebas de concepto para el uso en seres humanos (280,303,304,396).

Atendiendo al segundo objetivo de la tesis y como paso previo ineludible antes de proceder a la validación del proceso de fabricación descrito en el dossier del PEI, hubo que trasladar en soporte escrito lo reflejado en dicho dossier al sistema de gestión de la calidad de la UPC. Para ello se redactó toda la documentación relativa a la producción siguiendo las pautas descritas en el Capítulo 4 (Documentación) de las Normas de Correcta Fabricación (394).

La buena documentación es una parte esencial del sistema de gestión de la calidad. Para garantizar la calidad de los medicamentos no basta con el análisis del producto terminado, sino que es necesario controlar paso por paso todo el proceso de fabricación. Es tan importante conseguir un medicamento eficaz y seguro que ninguna posible actuación debe dejarse al azar, sino que debe haber una definición estricta de los procesos de fabricación y de los controles que se deben realizar durante los mismos, así como de los resultados requeridos.

Uno de los objetivos de las NCF es garantizar en la medida de lo posible la reproducibilidad de los lotes fabricados. Sin embargo en el campo de la terapia celular garantizar este punto es difícil ya que con frecuencia los materiales de partida son productos autólogos, “vivos”, con

características distintas inherentes a cada paciente que muy probablemente van a influir en todo el desarrollo y en las características del producto final.

Por estas peculiaridades que posee la terapia celular personalizada y porque es nuestra obligación como Unidad de Producción Celular para investigación clínica la recogida rigurosa de datos, consideramos que más que en ningún otro caso es esencial disponer de un buen sistema documental donde todas las instrucciones estén claramente descritas y donde se puedan recoger de forma sencilla y operativa el mayor número de datos de interés posible para futuros análisis.

En base a esto, se elaboraron la fórmula patrón de fabricación del medicamento “Células mesenquimales troncales adultas de médula ósea autólogas expandidas y fucosiladas”, los procedimientos normalizados de trabajo inherentes al proceso de obtención de material de partida, expansión de mesenquimales y fucosilación, guías de fabricación de lote, especificaciones, registros y protocolos de validación, etc., tal y como se ha reflejado en el apartado Resultados del presente trabajo de tesis.

El sistema documental de la UPC es un sistema dinámico que se revisa con una periodicidad establecida según el tipo de documento, sin embargo, durante las validaciones tanto del media fill como sobre todo, del proceso de fabricación, se detectaron numerosos aspectos susceptibles de mejora en la documentación, por lo que se realizaron las solicitudes de cambio pertinentes que, una vez aprobadas llevaron a la corrección de los documentos y edición y aprobación de las nuevas versiones que pasaron a ser vigentes, quedando las anteriores obsoletas.

En este apartado, de difícil discusión queríamos resaltar la importancia de las validaciones en la revisión de todo el sistema de calidad, incluido el sistema documental. Durante las mismas se puede comprobar si los documentos que se han generado con anterioridad, aseguran que se cumplan todos los pasos necesarios en la fabricación y la toma de controles de calidad y sobre todo si se adecúan y facilitan el ritmo de trabajo de la Unidad.

Si el sistema de recogida de datos y verificaciones que hemos diseñado hace que se pierdan pasos en el proceso de fabricación, retrasa las liberaciones de los lotes o nos obliga a tener que “dejar cosas para después” deberemos asumir que es necesario un cambio para hacerlo más funcional. El papel del responsable de Garantía de Calidad es esencial en este sentido.

Enlazando con el objetivo anterior, una vez redactado el protocolo de validación del proceso aséptico y la guía de fabricación de lote en la que quedan reflejados todos los datos relativos a esta validación se procedió a trabajar el 3º objetivo de esta tesis.

La fabricación de productos estériles es objeto de requisitos especiales con el fin de minimizar los riesgos de contaminación microbiológica y de contaminación de partículas y pirógenos. La validación del proceso aséptico está orientada a demostrar que, en las condiciones y con los reactivos y materiales previstos, no se introducen contaminantes durante todo el proceso de producción. A esta prueba se la denomina “Media Fill” y consiste en realizar el mismo proceso

de producción descrito en el PNT correspondiente, pero sin añadir células. Esta prueba depende mucho de la habilidad, la formación y las aptitudes del personal involucrado.

A través de esta validación se demuestra la capacidad de manipulación en condiciones asépticas de todo el personal implicado en los procesos de producción, así como la idoneidad de la instalación, el equipamiento, los materiales empleados y el sistema de garantía de calidad, por lo que este procedimiento supone una validación global de todos estos elementos.

Nuestros resultados muestran que el medio de cultivo BHI utilizado es adecuado para las pruebas de simulación del proceso aséptico ya que permite un crecimiento eficiente de los microorganismos aerobios mesófilos totales incluyendo bacterias, levaduras y hongos patógenos que son de difícil crecimiento en medios no selectivos. Este medio muestra un crecimiento rápido de cepas como *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e incluso levaduras como *Candida albicans*. Así mismo es muy eficaz para la detección visual de crecimiento por turbidez gracias a la claridad que posee. Además, el crecimiento de los microorganismos patógenos en dicho medio no se vio inhibido al ser puesto en contacto con nuestro sistema de producción demostrándose así que ninguno de los materiales o reactivos utilizados tiene actividad fungicida y bactericida, por tanto su utilización no daría lugar a falsos negativos. Todo lo anterior es concordante con las especificaciones y recomendaciones técnicas acerca de este medio emitidas por la EMA (410). Los resultados obtenidos muestran que los operarios cumplen satisfactoriamente el proceso de producción en esterilidad ya que no se observó crecimiento microbiano en ninguna de las muestras de BHI analizadas. En general, todos los resultados obtenidos de la validación del media fill se encontraban dentro de los parámetros establecidos.

En relación al 4º objetivo, la validación del proceso de producción consistió en demostrar que en las condiciones de producción establecidas (fuente celular, cantidad de muestra de partida, reactivos, método de expansión o período de cultivo, entre otras) se consigue un producto final que cumple con las especificaciones requeridas (concentración celular, viabilidad y fenotipo, entre otros.).

En nuestro caso llevamos a cabo dicha validación de forma prospectiva con la producción de cuatro lotes de Medicamento, uno más de lo exigido por la AEMPS. Sin embargo el material de partida consistió en tres muestras de médula ósea de pacientes distintos, una de las cuales se utilizó para validar a su vez el Banco Celular de Reserva que dio lugar al cuarto lote producido. Se aisló la fracción mononuclear de cada muestra de médula por método automatizado con Sepax y se realizó su expansión siguiendo el PNT correspondiente, efectuando todas las manipulaciones y controles y analizando los resultados. El proceso completo a escala clínica se llevó a cabo por todo el personal implicado para demostrar la consistencia de los lotes y del proceso y la integridad funcional de las células durante la fabricación independientemente del operador.

Las muestras de MO se obtuvieron de donantes altruistas tras la firma de consentimiento informado. Las especificaciones del material biológico de partida (médula ósea para uso autólogo) incluyen un estudio serológico del donante para VIH, VHB, VHC, sífilis HTLV I y II y PCR de

VHC (310,312). Desde el punto vista técnico el harvest de médula ósea fue realizado por hematólogos especialistas de nuestro servicio altamente cualificados.

Los sistemas automatizados de aislamiento de células se están desarrollando actualmente para facilitar la aplicación clínica de las terapias celulares. La fracción de células mononucleares (CMN) de las muestras de MO se llevó a cabo con el procesador celular Sepax que permite trabajar en ambientes menos restrictivos ya que la muestra queda protegida en todo momento del ambiente exterior. Este sistema ya ha sido validado por otros autores para aislar y concentrar células nucleadas de cordón umbilical, sangre periférica o médula ósea (411,412), habiendo contribuido nuestro grupo a dichas aportaciones (413). Además no hay evidencias de que existan diferencias en la expansión, características funcionales o subpoblaciones de CSM obtenidas con dicho sistema frente al método de aislamiento manual y su rendimiento y reproducibilidad son más elevados, necesitando una mínima intervención del operador (414).

La población de CMN obtenida se cultivó, seleccionando con sucesivos cambios de medio a las CSM por su adherencia al plástico, morfología fibroblástica e inmunofenotipo (345). El número de duplicaciones hasta llegar al pase adecuado para obtener la dosis clínica celular no superó las 20 duplicaciones criterio establecido para evitar la entrada en senescencia (395), estando en todos los casos por debajo de nueve. Otros autores restan importancia al número de duplicaciones, dando más valor al número de pase (415) que en nuestros lotes de validación tampoco superó los cuatro pases en cultivo.

Una vez obtenida la dosis celular prevista (en nuestro caso entre pase 2 y 3), se trataron las células con FTVII en un buffer fisiológico compuesto en su totalidad por reactivos de grado GMP para forzar la exofucosilación del antígeno de superficie CD44. Es de resaltar la peculiaridad técnica que tiene la fucosilación simultánea de más de 100 millones de células mesenquimales, algo que hasta el momento nadie había realizado a escala clínica y en sistema abierto. Posteriormente se lavaron las células, se envasaron y se acondicionaron (producto final) siguiendo el PNT establecido, tomando muestras para analizar la viabilidad, fenotipo, microbiología, tumorigénesis y potencial de diferenciación.

La viabilidad no se vio afectada por el tratamiento enzimático manteniéndose ésta siempre por encima de la establecida previamente en la especificación y siendo confirmada con dos técnicas analíticas distintas, método de exclusión con Azul tripan y por citometría de flujo con Anexina y Ioduro de Propidio (Tabla 11).

La eficacia de la fucosilación se comprobó mediante citometría de flujo midiéndose la expresión de HECA452 y su capacidad de unión a E-selectina. Ambos parámetros se fueron positivos en el 100% de las muestras. Además las cuatro muestras analizadas (Figura 39) mostraron un perfil inmunofenotípico aceptado por la ISCT para las Células Stem Mesenquimales humanas, es decir elevada expresión de CD105, CD73 y CD90 y ausencia de expresión de CD45, CD34, CD14 y CD20 (40–43). En nuestro caso, los marcadores estudiados son suficientes para discriminar a las CSM del resto por el perfil fenotípico de los componentes de la médula.

Nuestros resultados no mostraron contaminación microbiológica ni en el producto final ni en ninguna de las fases del cultivo de los lotes validados pese a retirar el antibiótico del medio de cultivo a partir de pase uno para evitar reacciones adversas relacionadas con las trazas de antibiótico a la hora de infundir de las células.

Además, dado que el resultado del test de esterilidad en producto final no se va a obtener antes de la administración del medicamento, se realizó una liberación paramétrica (es decir, se libera de forma temprana por la caducidad de las células sin tener este resultado en producto final en base a los resultados previos negativos) pero incluyendo un test rápido, el test de Gram, aprobado por la Farmacopea Europea (349,350) que fue también negativo en todos los lotes.

Tampoco se detectó presencia de Mycoplasma mediante PcR, lo que confirma la baja incidencia de la infección por micoplasma en los cultivos celulares reportada por otros autores (416) a pesar de ser otra determinación exigida en la normativa (352).

El nivel de endotoxinas se mantuvo siempre por debajo de los límites aceptables para la administración parenteral de medicamento y el método analítico utilizado también se ajustó a las indicaciones de la Farmacopea (351).

La tumorigénesis en nuestro caso fue testada por cariotipo y por nivel de expresión de C-myc medido mediante qPcR. Ambos análisis mostraron resultados normales en todos los lotes, lo que concuerda con estudios previos (353,417). Nuestros resultados apoyan los de Crespo *et al* (331) que informan de la protección frente a la inestabilidad cromosómica y el mantenimiento de la multipotencialidad de las CSM humanas cultivadas con lisado plaquetario. Por otro lado, el análisis de Ben- David *et al.* (418) revela que las CSM tienen un 4% de probabilidad de la adquisición de anomalías cromosómicas. Sin embargo, este estudio ha sido discutido por el grupo de Sensebe (419).

La potencialidad de las CSM se estudió induciendo dicha diferenciación con medios específicos. Las células obtenidas de los cuatro lotes de validación fueron capaces de diferenciarse hacia tejido óseo, adiposo y cartilaginoso.

Para establecer la caducidad y las condiciones de almacenamiento del medicamento se llevó a cabo un estudio de estabilidad. Tras la ejecución del dicho estudio se concluyó que el medicamento “Células mesenquimales troncales adultas autólogas de médula ósea expandidas fucosiladas” se mantiene estables almacenado a 4°C durante 48 horas. Durante este tiempo no se observan cambios fenotípicos, la viabilidad se mantiene en torno al 90% y la expresión de HECA no varía.

Consideramos que en base a nuestros resultados y a las características transitorias de la modificación enzimática, la infusión intravenosa de este tipo celular producido a escala clínica puede constituir un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de enfermedades sistémicas, salvando al menos parcialmente, el actual problema de la vía de infusión y anidamiento de las CSM en número y cantidad adecuada para la reparación tisular en enfermedades sistémicas.

Además no se espera que en su traslación a la clínica el medicamento produzca ninguna respuesta inmune en el receptor ya que se trata de células autólogas y en cuya producción no empleamos ningún derivado de origen animal, ya que en nuestro proceso sustituimos el suero bovino fetal por lisado plaquetario, de origen humano. La seguridad de la modificación mediante fucosilación en la superficie de la célula ya ha sido probada para uso clínico en otros tipos celulares. Concretamente Shpall y Colaboradores han realizando en el M.D. Anderson Cancer Center un ensayo clínico fase I con 50 pacientes con hemopatías malignas sometidos a trasplante de sangre de cordón umbilical en el que estudian la fucosilación como un medio para aumentar el "homing" y el injerto. Sus resultados, publicados recientemente no mostraron ningún problema de seguridad (420).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Nuestros datos demuestran que hemos desarrollado un protocolo original de expansión y fucosilación de CSM de médula ósea humana a escala clínica según las normas de correcta fabricación del medicamento, y ello hace posible su uso en seres humanos.
2. Las células CSM-MO se fucosilan eficazmente, expandidas con nuestro protocolo de cultivo, sin aditivos de origen animal y utilizando lisado plaquetario.
3. La documentación elaborada para producir el medicamento CSM-MO fucosiladas a gran escala y en condiciones GMP se ha llevado a cabo con éxito y cumple las exigencias de la normativa europea y la establecida por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios.
4. La simulación del proceso de fabricación del medicamento CSM-MO fucosiladas en grado GMP se realiza en completa esterilidad por todos los operadores que participan en el proceso de producción.
5. Se ha conseguido validar el proceso de producción. La validación del proceso de fabricación del medicamento CSM-MO fucosiladas en grado GMP, y utilizando por primera vez el sistema cerrado Sepax, fue llevada a cabo en completa esterilidad por todos los operadores.
6. El medicamento CSM-MO fucosiladas en nuestra sala de producción celular es apto para su uso clínico ya que cumple con las especificaciones establecidos en base a las normas de correcta fabricación. Además, hemos demostrado que este medicamento se mantiene estable y con todas sus propiedades funcionales durante 48 horas conservado a 4°C.

REFERENCIAS

1. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood*. 2002 May 1;99(9):3089–101.
2. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427–30.
3. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007 Nov;25(11):2896–902.
4. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2003 Aug;69(3):250–6.
5. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. [Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application]. *Rev Investig Clínica Organo Hosp Enfermedades Nutr*. 2006 Oct;58(5):498–511.
6. Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006 Sep;1(3):365–9.
7. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng*. 2010 Aug 15;12:87–117.
8. Zhang J, Li Z-G, Si Y-M, Chen B, Meng J. The difference on the osteogenic differentiation between periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironments. *Differ Res Biol Divers*. 2014 Dec;88(4-5):97–105.
9. Herlofsen SR, Høiby T, Cacchiarelli D, Zhang X, Mikkelsen TS, Brinchmann JE. Brief report: importance of SOX8 for in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2014 Jun;32(6):1629–35.
10. Dai L, Hu X, Zhang X, Zhu J, Zhang J, Fu X, et al. Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12. *J Transl Med*. 2015;13:200.
11. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006 Dec;18(6):1089–96.
12. Fu Q, Song X-F, Liao G-L, Deng C-L, Cui L. Myoblasts differentiated from adipose-derived stem cells to treat stress urinary incontinence. *Urology*. 2010 Mar;75(3):718–23.
13. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol*. 2006 Apr 28;109(1):74–81.
14. Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J, Wang T. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2011 May;15(5):1032–43.
15. Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007 Oct;21(12):3197–207.
16. Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. *Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med*. 1867 Sep;40(1-2):1–79.
17. Maximow AA. VOL. IV OCTOBER, 1924 No. 4 RELATION OF BLOOD CELLS TO CONNECTIVE TISSUES AND ENDOTHELIUM. *Physiol Rev*. 1924;4(4):533.

18. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966 Dec;16(3):381–90.
19. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230–47.
20. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974 Apr;17(4):331–40.
21. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5):267–74.
22. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:63–76.
23. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42–60.
24. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop.* 1991 Jan;(262):298–311.
25. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13(1):69–80.
26. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 1992;13(1):81–8.
27. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 1991 Sep;9(5):641–50.
28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
29. Koike C, Zhou K, Takeda Y, Fathy M, Okabe M, Yoshida T, et al. Characterization of Amniotic Stem Cells. *Cell Reprogramming.* 2014 Aug 1;16(4):298–305.
30. Luna AC, Madeira ME, Conceição TO, Moreira JA, Laiso RA, Maria DA. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes [Internet].* 2014 Aug 20 [cited 2015 Oct 29];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156637/>
31. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med.* 2013 Mar;11(3):235–42.
32. Owen M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum.* 1980 Oct;23(10):1073–80.
33. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop.* 1980 Sep;(151):294–307.
34. Mets T, Verdonk G. Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging. *Mech Ageing Dev.* 1981 Jan;15(1):41–9.
35. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3213–8.

36. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*. 2001;3(5):393–6.
37. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2002;20(6):530–41.
38. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005 Feb;29(2):215–24.
39. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002 Dec;46(12):3349–60.
40. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar 1;50(3):817–27.
41. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402–16.
42. Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 24;332(1):297–303.
43. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008 Feb;47(2):126–31.
44. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301–13.
45. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324–36.
46. Boquest AC, Shahdadfar A, Brinchmann JE, Collas P. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2006;325:35–46.
47. Varma MJO, Breuls RGM, Schouten TE, Jurgens WJFM, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007 Feb;16(1):91–104.
48. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006 Jul;208(1):64–76.
49. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006 Feb;24(2):376–85.
50. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, Donnenberg AD. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2013 Jan;83(1):134–40.
51. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):55–62.

52. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994 Dec 15;84(12):4164–73.
53. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*. 2001 Feb;28(2):174–81.
54. Lin C-S, Xin Z-C, Deng C-H, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010 Jun;25(6):807–15.
55. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2013 Feb;9(1):32–43.
56. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):229–30.
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
58. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5–14.
59. Hwang NS, Zhang C, Hwang Y-S, Varghese S. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 Aug;1(1):97–106.
60. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):463–77.
61. Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, et al. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int*. 2011;2011:201371.
62. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, et al. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2003 Jun;50(6):610–7.
63. Yang L, Tao T, Wang X, Du N, Chen W, Tao S, et al. Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Sep;116(9):1357–60.
64. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*. 2009;10:29.
65. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747–54.
66. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, et al. *Runx2* control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*. 2004 May 24;23(24):4315–29.
67. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990 Jun;143(3):420–30.
68. Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006 Jun;24(6):1487–95.

69. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*. 2006 Aug;48(6):361–70.
70. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41227–36.
71. Tapp H, Deepe R, Ingram JA, Kuremsky M, Hanley EN, Gruber HE. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R89.
72. Sun L, Nicholson AC, Hajjar DP, Gotto AM, Han J. Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. *J Lipid Res*. 2003 Oct;44(10):1877–86.
73. Teruel T, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J*. 1996 Oct 15;319 (Pt 2):627–32.
74. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*. 1997 Feb 7;272(6):3406–10.
75. Yanjie J, Jiping S, Yan Z, Xiaofeng Z, Boai Z, Yajun L. Effects of Notch-1 signalling pathway on differentiation of marrow mesenchymal stem cells into neurons in vitro. *Neuroreport*. 2007 Sep 17;18(14):1443–7.
76. Wang S, Kan Q, Sun Y, Han R, Zhang G, Peng T, et al. Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. 2013 Feb;31(1):30–5.
77. Lee K-D, Kuo TK-C, Whang-Peng J, Chung Y-F, Lin C-T, Chou S-H, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology Baltim Md*. 2004 Dec;40(6):1275–84.
78. Chen L-B, Jiang X-B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol WJG*. 2004 Oct 15;10(20):3016–20.
79. Bhandari DR, Seo K-W, Roh K-H, Jung J-W, Kang S-K, Kang K-S. REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2010;5(5):e10493.
80. Baer PC, Griesche N, Luttmann W, Schubert R, Luttmann A, Geiger H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in vitro: evaluation of an optimal expansion medium preserving stemness. *Cytotherapy*. 2010;12(1):96–106.
81. Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc*. 2010 Jul;5(7):1294–311.
82. Tucker HA, Bunnell BA. Characterization of human adipose-derived stem cells using flow cytometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;702:121–31.
83. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001 Sep;3(9):778–84.

84. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond Engl*. 2004 Jul 10;364(9429):149–55.
85. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*. 2000;2(6):477–88.
86. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*. 2006 May;37(10):967–76.
87. Agha-Hosseini F, Jahani M-A, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant*. 2010 Apr;24(2):E23–8.
88. Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyüz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*. 2010 Jan;133(1):95–112.
89. Spath L, Rotilio V, Alessandrini M, Gambaro G, De Angelis L, Mancini M, et al. Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6B):1635–44.
90. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei A-C, Murray S, et al. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):989–96.
91. Adachi N, Sato K, Usas A, Fu FH, Ochi M, Han C-W, et al. Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol*. 2002 Sep;29(9):1920–30.
92. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):279–88.
93. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645–60.
94. Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron*. 2011 May 26;70(4):661–73.
95. Sekiya I, Muneta T, Koga H, Nimura A, Morito T, Shimaya M, et al. [Articular cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells]. *Clin Calcium*. 2011 Jun;21(6):879–89.
96. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2396–402.
97. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204–13.
98. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal CCS*. 2011;9:12.
99. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006 Sep;30(9):681–7.

100. Huang Y-C, Yang Z-M, Chen X-H, Tan M-Y, Wang J, Li X-Q, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Rev.* 2009 Sep;5(3):247–55.
101. Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH, et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 Feb;202(2):193.e1–193.e13.
102. Pilz GA, Ulrich C, Ruh M, Abele H, Schäfer R, Kluba T, et al. Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Apr;20(4):635–46.
103. Chang Y-J, Hwang S-M, Tseng C-P, Cheng F-C, Huang S-H, Hsu L-F, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs.* 2010;192(2):93–105.
104. Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, Tahan V, Miki T, Dorko K, et al. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2010 Mar;Chapter 1:Unit 1E.5.
105. Tsai M-S, Lee J-L, Chang Y-J, Hwang S-M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2004 Jun;19(6):1450–6.
106. Poloni A, Rosini V, Mondini E, Maurizi G, Mancini S, Discepoli G, et al. Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2008;10(7):690–7.
107. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1669–75.
108. Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Dec 1;185(11):6617–23.
109. Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, Payá Colmenero JA, Ferrón GO, Duran EL, et al. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta.* 2011 Jan;32(1):86–95.
110. Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2010 Jul;34(7):693–701.
111. Zhang Y, Ren Z, Zou C, Wang S, Luo B, Li F, et al. Insulin-producing cells from human pancreatic islet-derived progenitor cells following transplantation in mice. *Cell Biol Int.* 2011 May;35(5):483–90.
112. Perdikogianni C, Dimitriou H, Stiakaki E, Martimianaki G, Kalmanti M. Could cord blood be a source of mesenchymal stromal cells for clinical use? *Cytotherapy.* 2008;10(5):452–9.
113. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2005 Feb;23(2):220–9.
114. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med.* 2007;5:57.
115. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2008 Jul;26(7):1695–704.

116. Musina RA, Belyavski AV, Tarusova OV, Solovyova EV, Sukhikh GT. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. *Bull Exp Biol Med.* 2008 Apr;145(4):539–43.
117. Kyurkchiev S, Shterev A, Dimitrov R. Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua. *Reprod Biomed Online.* 2010 Mar;20(3):305–13.
118. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell.* 2010 May;23(2):35–40.
119. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2007 Jun;25(6):1384–92.
120. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006 May;24(5):1294–301.
121. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M, Guo Y-J, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2004;22(7):1330–7.
122. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007 Mar;327(3):449–62.
123. Kim J, Shin JM, Jeon YJ, Chung HM, Chae J-I. Proteomic validation of multifunctional molecules in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood. *PLoS One.* 2012;7(5):e32350.
124. Hsieh J-Y, Wang H-W, Chang S-J, Liao K-H, Lee I-H, Lin W-S, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One.* 2013;8(8):e72604.
125. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol.* 1996 Mar;166(3):585–92.
126. Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, Lordan JL. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Feb;105(2 Pt 1):193–204.
127. Doorn J, van de Peppel J, van Leeuwen JPTM, Groen N, van Blitterswijk CA, de Boer J. Pro-osteogenic trophic effects by PKA activation in human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials.* 2011 Sep;32(26):6089–98.
128. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001 Jun;7(6):259–64.
129. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008;3(4):e1886.
130. Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, Yazdi IK, Ferrari M, Simmons PJ, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryo-preservation. *Biomaterials.* 2012 Jul;33(21):5308–16.

131. Yang D, Sun S, Wang Z, Zhu P, Yang Z, Zhang B. Stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerate wound healing by migrating into skin injury areas. *Cell Reprogramming*. 2013 Jun;15(3):206–15.
132. Nakamura Y, Ishikawa H, Kawai K, Tabata Y, Suzuki S. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(37):9393–400.
133. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815–22.
134. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 May;8(5):569–81.
135. Uccelli A, Mancardi G, Chiesa S. Is there a role for mesenchymal stem cells in autoimmune diseases? *Autoimmunity*. 2008 Dec;41(8):592–5.
136. Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2011 Jul;29(7):1137–48.
137. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667–79.
138. Guan X-J, Song L, Han F-F, Cui Z-L, Chen X, Guo X-J, et al. Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *J Cell Biochem*. 2013 Feb;114(2):323–35.
139. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6576–83.
140. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008 Jan;26(1):212–22.
141. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677–86.
142. Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol*. 2009 May;70(5):325–30.
143. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883–99.
144. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Conget P. The antidiabetic effect of MSCs is not impaired by insulin prophylaxis and is not improved by a second dose of cells. *PLoS One*. 2011;6(1):e16566.
145. Tollervey JR, Lunyak VV. Adult stem cells: simply a tool for regenerative medicine or an additional piece in the puzzle of human aging? *Cell Cycle Georget Tex*. 2011 Dec 15;10(24):4173–6.
146. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 May;298(5):R1173–87.

147. Choi EW, Shin IS, Lee HW, Park SY, Park JH, Nam MH, et al. Transplantation of CTLA4lg gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis. *J Gene Med*. 2011 Jan;13(1):3–16.
148. Kong Q-F, Sun B, Bai S-S, Zhai D-X, Wang G-Y, Liu Y-M, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J Neuroimmunol*. 2009 Feb 15;207(1-2):83–91.
149. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*. 2008 Oct;18(5):349–55.
150. Mokarram N, Merchant A, Mukhatyar V, Patel G, Bellamkonda RV. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 2012 Dec;33(34):8793–801.
151. Siegel G, Schäfer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2009 May 15;87(9 Suppl):S45–9.
152. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890–6.
153. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008 May;26(5):1275–87.
154. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4057–65.
155. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012 Dec 12;308(22):2369–79.
156. Huang X-P, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*. 2010 Dec 7;122(23):2419–29.
157. Cselenyák A, Pankotai E, Horváth EM, Kiss L, Lacza Z. Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*. 2010;11:29.
158. Li N, Sarojini H, An J, Wang E. Prosaposin in the secretome of marrow stroma-derived neural progenitor cells protects neural cells from apoptotic death. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(6):1527–38.
159. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5673–83.
160. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006 Apr;20(6):661–9.

161. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726–36.
162. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gnecci M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 30;104(5):1643–8.
163. Alfaro MP, Pagni M, Vincent A, Atkinson J, Hill MF, Cates J, et al. The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 25;105(47):18366–71.
164. Zhang Z, Deb A, Zhang Z, Pachori A, He W, Guo J, et al. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Mar;46(3):370–7.
165. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2009 Mar;27(3):670–81.
166. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia.* 2002 Sep;16(9):1713–24.
167. Park K-S, Kim Y-S, Kim J-H, Choi B, Kim S-H, Tan AH-K, et al. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation.* 2010 Mar 15;89(5):509–17.
168. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004 Mar 16;109(10):1292–8.
169. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem.* 1997 Jun 13;272(24):15258–63.
170. Wu H, Zhang G, Minton JE, Ross CR, Blecha F. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun.* 2000 Oct;68(10):5552–8.
171. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res.* 2006;7:29.
172. Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N, Ståhle-Bäckdahl M. The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun.* 1999 May;67(5):2561–6.
173. Nijnik A, Hancock REW. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol.* 2009 Jan;16(1):41–7.
174. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, et al. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 10;106(10):3806–11.
175. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009 Jul;58(7):929–39.

176. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee J-W, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2010 Dec;28(12):2229–38.
177. Bonfield TL, Lennon D, Ghosh SK, DiMarino AM, Weinberg A, Caplan AI. Cell based therapy aides in infection and inflammation resolution in the murine model of cystic fibrosis lung disease. *Stem Cell Discov*. 2013;03(02):139–53.
178. Weiss DJ, Bertoncetto I, Borok Z, Kim C, Panoskaltsis-Mortari A, Reynolds S, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*. 2011 Jun;8(3):223–72.
179. Haniffa MA, Wang X-N, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Aug 1;179(3):1595–604.
180. Meisel R, Brockers S, Heseler K, Degistirici O, Bülle H, Woite C, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*. 2011 Apr;25(4):648–54.
181. Lennon DP, Haynesworth SE, Bruder SP, Jaiswal N, Caplan AI. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. 1996 Nov;32(10):602–11.
182. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999 Nov;107(2):275–81.
183. Kassem M, Ankersen L, Eriksen EF, Clark BF, Rattan SI. Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 1997;7(6):514–24.
184. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*. 1997 Sep;21(3):225–35.
185. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. 1999 Dec 1;75(3):424–36.
186. Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S, Zaia J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 30;289(2):519–24.
187. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1998 Apr;13(4):655–63.
188. Ghadge SK, Mühlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*. 2011 Jan;129(1):97–108.
189. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):123–8.

190. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):845–8.
191. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):50–6.
192. Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2005 Nov;12(6):444–50.
193. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1033–6.
194. Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev*. 2003 Oct;195:58–71.
195. Schreiber TH, Shinder V, Cain DW, Alon R, Sackstein R. Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration: implications for locomotion and the multistep paradigm. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1381–6.
196. Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, Ley K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol*. 1997 Feb 10;136(3):717–27.
197. Finger EB, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA. Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature*. 1996 Jan 18;379(6562):266–9.
198. Alon R, Chen S, Puri KD, Finger EB, Springer TA. The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J Cell Biol*. 1997 Sep 8;138(5):1169–80.
199. Resto VA, Burdick MM, Dagia NM, McCammon SD, Fennwald SM, Sackstein R. L-selectin-mediated lymphocyte-cancer cell interactions under low fluid shear conditions. *J Biol Chem*. 2008 Jun 6;283(23):15816–24.
200. Kansas GS, Wood GS, Fishwild DM, Engleman EG. Functional characterization of human T lymphocyte subsets distinguished by monoclonal anti-leu-8. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1985 May;134(5):2995–3002.
201. Kansas GS, Dailey MO. Expression of adhesion structures during B cell development in man. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1989 May 1;142(9):3058–62.
202. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1993 Feb 1;150(3):1105–21.
203. Lund-Johansen F, Terstappen LW. Differential surface expression of cell adhesion molecules during granulocyte maturation. *J Leukoc Biol*. 1993 Jul;54(1):47–55.
204. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2006 Jan;12(1 Suppl 1):2–8.
205. Evans SS, Collea RP, Appenheimer MM, Gollnick SO. Interferon-alpha induces the expression of the L-selectin homing receptor in human B lymphoid cells. *J Cell Biol*. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1889–98.
206. Sackstein R, Meng L, Xu XM, Chin YH. Evidence of post-transcriptional regulation of L-selectin gene expression in rat lymphoid cells. *Immunology*. 1995 Jun;85(2):198–204.

207. Schweitzer KM, Dräger AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP, et al. Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol.* 1996 Jan;148(1):165–75.
208. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24;95(24):14423–8.
209. Weninger W, Ulfman LH, Cheng G, Souchkova N, Quackenbush EJ, Lowe JB, et al. Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity.* 2000 Jun;12(6):665–76.
210. Sackstein R. The bone marrow is akin to skin: HCELL and the biology of hematopoietic stem cell homing. *J Invest Dermatol.* 2004 May;122(5):1061–9.
211. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res.* 1996 Sep;79(3):560–9.
212. Asako H, Kurose I, Wolf R, DeFrees S, Zheng ZL, Phillips ML, et al. Role of H1 receptors and P-selectin in histamine-induced leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1508–15.
213. Kubes P, Kanwar S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1994 Apr 1;152(7):3570–7.
214. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):181–213.
215. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1993 Dec 1;151(11):6338–46.
216. Lawrence MB, Berg EL, Butcher EC, Springer TA. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. *Eur J Immunol.* 1995 Apr;25(4):1025–31.
217. Jung U, Bullard DC, Tedder TF, Ley K. Velocity differences between L- and P-selectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo. *Am J Physiol.* 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2740–7.
218. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 Jun 1;162(11):6755–62.
219. Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res.* 1998 Aug 10;83(3):287–94.
220. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest.* 1998 Oct 15;102(8):1526–33.
221. Berg EL, Robinson MK, Mansson O, Butcher EC, Magnani JL. A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J Biol Chem.* 1991 Aug 15;266(23):14869–72.
222. Berg EL, Magnani J, Warnock RA, Robinson MK, Butcher EC. Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind the E-selectin ligands sialyl Le(x) and sialyl Le(a). *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Apr 30;184(2):1048–55.
223. Handa K, Nudelman ED, Stroud MR, Shiozawa T, Hakomori S. Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le(a) and sialosyl-Le(x), and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Dec 31;181(3):1223–30.

224. Renkonen O. Enzymatic in vitro synthesis of I-branches of mammalian polylectosamines: generation of scaffolds for multiple selectin-binding saccharide determinants. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2000 Sep;57(10):1423–39.
225. Kasai K, Kameya T, Okuda T, Terasaki PI, Iwaki Y. Immunohistochemical examination of lung cancers using monoclonal antibodies reacting with sialosylated Lewisx and sialosylated Lewisa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986;410(3):253–61.
226. Zhang K, Baeckström D, Brevinge H, Hansson GC. Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leukocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *J Cell Biochem*. 1996 Mar 15;60(4):538–49.
227. Hey NA, Aplin JD. Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconj J*. 1996 Oct;13(5):769–79.
228. Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J*. 1997 Aug;14(5):577–84.
229. Magnani JL. The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Jun 15;426(2):122–31.
230. Tyrrell D, James P, Rao N, Foxall C, Abbas S, Dasgupta F, et al. Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10372–6.
231. Poppe L, Brown GS, Philo JS, Nikrad PV, Shah BH. Conformation of sLex Tetrasaccharide, Free in Solution and Bound to E-, P-, and L-Selectin,. *J Am Chem Soc*. 1997 Feb 1;119(7):1727–36.
232. Duijvestijn AM, Horst E, Pals ST, Rouse BN, Steere AC, Picker LJ, et al. High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal anti-body HECA-452. *Am J Pathol*. 1988 Jan;130(1):147–55.
233. Picker LJ, Terstappen LW, Rott LS, Streeter PR, Stein H, Butcher EC. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1990 Nov 15;145(10):3247–55.
234. Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*. 1990 May;136(5):1053–68.
235. Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):978–81.
236. Fuhlbrigge RC, King SL, Dimitroff CJ, Kupper TS, Sackstein R. Direct real-time observation of E- and P-selectin-mediated rolling on cutaneous lymphocyte-associated antigen immobilized on Western blots. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jun 1;168(11):5645–51.
237. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*. 2001 Jun 11;153(6):1277–86.
238. Matsumoto M, Shigeta A, Furukawa Y, Tanaka T, Miyasaka M, Hirata T. CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Feb 15;178(4):2499–506.
239. Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R, Kupper TS. CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1421–6.

240. Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost.* 1999 Jan;81(1):1–7.
241. Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J Biol Chem.* 1996 Feb 9;271(6):3255–64.
242. Tauxe C, Xie X, Joffraud M, Martinez M, Schapira M, Spertini O. P-selectin glycoprotein ligand-1 decameric repeats regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *J Biol Chem.* 2008 Oct 17;283(42):28536–45.
243. Alcaide P, King SL, Dimitroff CJ, Lim Y-C, Fuhlbrigge RC, Luscinskas FW. The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo. *J Invest Dermatol.* 2007 Aug;127(8):1964–72.
244. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):181–7.
245. Dimitroff CJ, Lee JY, Schor KS, Sandmaier BM, Sackstein R. differential L-selectin binding activities of human hematopoietic cell L-selectin ligands, HCELL and PSGL-1. *J Biol Chem.* 2001 Dec 14;276(50):47623–31.
246. Oxley SM, Sackstein R. Detection of an L-selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood.* 1994 Nov 15;84(10):3299–306.
247. Sackstein R. Expression of an L-selectin ligand on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol.* 1997;97(1-2):22–8.
248. Czapinski JL, Bertozzi CR. Synthetic glycobiology: Exploits in the Golgi compartment. *Curr Opin Chem Biol.* 2006 Dec;10(6):645–51.
249. Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev.* 2002 Aug;186:19–36.
250. Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM. ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. *Cell.* 1990 Nov 2;63(3):475–84.
251. Goelz SE, Hession C, Goff D, Griffiths B, Tizard R, Newman B, et al. ELFT: a gene that directs the expression of an ELAM-1 ligand. *Cell.* 1990 Dec 21;63(6):1349–56.
252. Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology.* 2006 Dec;16(12):158R – 184R.
253. Huang M-C, Laskowska A, Vestweber D, Wild MK. The alpha (1,3)-fucosyltransferase Fuc-TIV, but not Fuc-TVII, generates sialyl Lewis X-like epitopes preferentially on glycolipids. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47786–95.
254. Niemelä R, Natunen J, Majuri ML, Maaheimo H, Helin J, Lowe JB, et al. Complementary acceptor and site specificities of Fuc-TIV and Fuc-TVII allow effective biosynthesis of sialyl-TriLex and related polyactosamines present on glycoprotein counterreceptors of selectins. *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):4021–6.
255. Bengtson P, Lundblad A, Larson G, Pålsson P. Polymorphonuclear leukocytes from individuals carrying the G329A mutation in the alpha 1,3-fucosyltransferase VII gene (FUT7) roll on E- and P-selectins. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Oct 1;169(7):3940–6.

256. Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med*. 1995 Feb 1;181(2):747–53.
257. Wagers AJ, Waters CM, Stoolman LM, Kansas GS. Interleukin 12 and interleukin 4 control T cell adhesion to endothelial selectins through opposite effects on alpha1, 3-fucosyltransferase VII gene expression. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2225–31.
258. Nakayama F, Teraki Y, Kudo T, Togayachi A, Iwasaki H, Tamatani T, et al. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen regulated by a set of glycosyltransferases in human T cells: involvement of alpha1, 3-fucosyltransferase VII and beta1,4-galactosyltransferase I. *J Invest Dermatol*. 2000 Aug;115(2):299–306.
259. Blander JM, Visintin I, Janeway CA, Medzhitov R. Alpha(1,3)-fucosyltransferase VII and alpha(2,3)-sialyltransferase IV are up-regulated in activated CD4 T cells and maintained after their differentiation into Th1 and migration into inflammatory sites. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Oct 1;163(7):3746–52.
260. Lim YC, Henault L, Wagers AJ, Kansas GS, Luscinskas FW, Lichtman AH. Expression of functional selectin ligands on Th cells is differentially regulated by IL-12 and IL-4. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Mar 15;162(6):3193–201.
261. Beyer TA, Rearick JI, Paulson JC, Prieels JP, Sadler JE, Hill RL. Biosynthesis of mammalian glycoproteins. Glycosylation pathways in the synthesis of the nonreducing terminal sequences. *J Biol Chem*. 1979 Dec 25;254(24):12531–4.
262. Sadler JE, Paulson JC, Hill RL. The role of sialic acid in the expression of human MN blood group antigens. *J Biol Chem*. 1979 Mar 25;254(6):2112–9.
263. Whiteheart SW, Passaniti A, Reichner JS, Holt GD, Haltiwanger RS, Hart GW. Glycosyltransferase probes. *Methods Enzymol*. 1989;179:82–95.
264. Markwell MA, Paulson JC. Sendai virus utilizes specific sialyloligosaccharides as host cell receptor determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Oct;77(10):5693–7.
265. Liukkonen J, Haataja S, Tikkanen K, Kelm S, Finne J. Identification of N-acetylneuraminyl alpha 2-->3 poly-N-acetyllactosamine glycans as the receptors of sialic acid-binding *Streptococcus suis* strains. *J Biol Chem*. 1992 Oct 15;267(29):21105–11.
266. Viitala J, Finne J. Specific cell-surface labeling of polyglycosyl chains in human erythrocytes and HL-60 cells using endo-beta-galactosidase and galactosyltransferase. *Eur J Biochem FEBS*. 1984 Jan 16;138(2):393–7.
267. Whiteheart SW, Hart GW. Sialyltransferases as specific cell surface probes of terminal and penultimate saccharide structures on living cells. *Anal Biochem*. 1987 May 15;163(1):123–35.
268. Carroll SM, Paulson JC. Differential infection of receptor-modified host cells by receptor-specific influenza viruses. *Virus Res*. 1985 Sep;3(2):165–79.
269. Palcic MM. Glycosyltransferases in glycobiology. *Methods Enzymol*. 1994;230:300–16.
270. Warnock D, Bai X, Autote K, Gonzales J, Kinealy K, Yan B, et al. In vitro galactosylation of human IgG at 1 kg scale using recombinant galactosyltransferase. *Biotechnol Bioeng*. 2005 Dec 30;92(7):831–42.
271. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:521–55.

272. Altieri DC. Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1991 Sep 15;147(6):1891–8.
273. Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*. 1995 Mar;128(6):1243–53.
274. Takamatsu Y, Simmons PJ, Lévesque JP. Dual control by divalent cations and mitogenic cytokines of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity expressed by human hemopoietic cells. *Cell Adhes Commun*. 1998 Jul;5(5):349–66.
275. Chigaev A, Blenc AM, Braaten JV, Kumaraswamy N, Kepley CL, Andrews RP, et al. Real time analysis of the affinity regulation of alpha 4-integrin. The physiologically activated receptor is intermediate in affinity between resting and Mn(2+) or antibody activation. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):48670–8.
276. de Bruyn KMT, Rangarajan S, Reedquist KA, Figdor CG, Bos JL. The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):29468–76.
277. Suzuki T, Tsukamoto I. Manganese-induced apoptosis in hepatocytes after partial hepatectomy. *Eur J Pharmacol*. 2005 Nov 21;525(1-3):48–53.
278. Yang H, Sun Y, Zheng X. Manganese-induced apoptosis in rat myocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007;21(3):94–100.
279. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005 Jun 16;435(7044):969–73.
280. Xia L, McDaniel JM, Yago T, Doeden A, McEver RP. Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3091–6.
281. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999 Mar;5(3):309–13.
282. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8932–7.
283. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O’Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2643–5.
284. Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv*. 2006 Mar;7(1):19–24.
285. Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, et al. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):897–904.
286. Kumar S, Ponnazhagan S. Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007 Dec;21(14):3917–27.

287. Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jun;44(6):1072–84.
288. Shimizu Y, Van Seventer GA, Siraganian R, Wahl L, Shaw S. Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1989 Oct 15;143(8):2457–63.
289. Koopman G, van Kooyk Y, de Graaff M, Meyer CJ, Figdor CG, Pals ST. Triggering of the CD44 antigen on T lymphocytes promotes T cell adhesion through the LFA-1 pathway. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1990 Dec 1;145(11):3589–93.
290. Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Nambu Y, Matsuda E, et al. Chemokine-independent preference for T-helper-1 cells in transendothelial migration. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50948–58.
291. Nandi A, Estess P, Siegelman M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity.* 2004 Apr;20(4):455–65.
292. Wang H-S, Hung Y, Su C-H, Peng S-T, Guo Y-J, Lai M-C, et al. CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alpha L beta2) and VLA-4 (alpha4beta1). *Exp Cell Res.* 2005 Mar 10;304(1):116–26.
293. Pober JS. Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp.* 1987;131:170–84.
294. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1986 Mar 1;136(5):1680–7.
295. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9238–42.
296. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3916–22.
297. Peggs KS, Verfuert S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet Lond Engl.* 2003 Oct 25;362(9393):1375–7.
298. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JCU, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2004 Feb 2;199(3):303–13.
299. Sather BD, Treuting P, Perdue N, Miazgowiec M, Fontenot JD, Rudensky AY, et al. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1335–47.
300. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2008 Apr;8(4):299–308.
301. Srivastava G, Kaur KJ, Hindsgaul O, Palcic MM. Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase. *J Biol Chem.* 1992 Nov 5;267(31):22356–61.

302. Ramachandran V, Yago T, Epperson TK, Kobzdej MM, Nollert MU, Cummings RD, et al. Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10166–71.
303. Kobzdej MMA, Leppänen A, Ramachandran V, Cummings RD, McEver RP. Discordant expression of selectin ligands and sialyl Lewis x-related epitopes on murine myeloid cells. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4485–94.
304. Hidalgo A, Frenette PS. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):567–75.
305. Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. *Official J. Eur. Union L 324*. Available at <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:324:0121:0137:en:PDF>. Accessed January 07, 2014.
306. DIRECTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.
307. DIRECTIVA 2003/94/CE DE LA COMISIÓN de 8 de octubre de 2003 por la que se establecen los principios y directrices de las prácticas correctas de fabricación de los medicamentos de uso humano y de los medicamentos en investigación de uso humano.
308. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea de Medicamentos de uso humano y uso veterinario. Available from <http://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/home.htm>.
309. DIRECTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 31 de marzo de 2004 relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.
310. DIRECTIVA 2006/17/CE DE LA COMISIÓN de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.
311. DIRECTIVA 2006/86/CE DE LA COMISIÓN de 24 de octubre de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los requisitos de trazabilidad, la notificación de las reacciones y los efectos adversos graves y determinados requisitos técnicos para la codificación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos.
312. REAL DECRETO 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.
313. ISO14644-1:1999(en). Cleanrooms and associated controlled environment. Available from <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:14644:-1:ed-1:v1:en>.
314. EudraLex. Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 15: Qualification y Valitation (corrected version). Directives 91/356/EEC, as amended by Directive 2003/94/EC, and 91/412/EEC. Available

- at http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf. Accessed November 21, 2013.
315. EudraLex. Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products (corrected version). Directives 91/356/EEC, as amended by Directive 2003/94/EC, and 91/412/EEC. Available at http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf. Accessed November 21, 2013.
 316. Sensebé L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther*. 2011 Jan;22(1):19–26.
 317. Reinhardt J, Stühler A, Blümel J. Safety of bovine sera for production of mesenchymal stem cells for therapeutic use. *Hum Gene Ther*. 2011 Jun;22(6):775; author reply 776.
 318. European Medicines Agency (EMA) / Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products 2013. EMA/CHMP/BWP/457920/2012 rev 1.
 319. Kinzebach S, Bieback K. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal cells under xenogenic-free culture conditions. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;129:33–57.
 320. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007 May;25(5):1270–8.
 321. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2009 Sep;27(9):2331–41.
 322. Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Feb;20(2):129–39.
 323. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*. 2006;8(5):437–44.
 324. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, Rifón J, Muntion S, Diez Campelo M, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):1072–6.
 325. Schallmoser K, Rohde E, Bartmann C, Obenauf AC, Reinisch A, Strunk D. Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(4-5):271–6.
 326. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion (Paris)*. 2007 Aug;47(8):1436–46.
 327. Schallmoser K, Strunk D. Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;946:349–62.
 328. Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow

- mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*. 2012 May;14(5):540–54.
329. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang*. 2010 Jul 1;99(1):1–15.
330. Rauch C, Feifel E, Amann E-M, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*. 2011;28(4):305–16.
331. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 2011;20(6):797–811.
332. Dahl J-A, Duggal S, Coulston N, Millar D, Melki J, Shahdadfar A, et al. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Dev Biol*. 2008;52(8):1033–42.
333. Lange C, Cakiroglu F, Spiess A-N, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Oct;213(1):18–26.
334. Bieback K, Ha VA-T, Hecker A, Grassl M, Kinzebach S, Solz H, et al. Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Eng Part A*. 2010 Nov;16(11):3467–84.
335. Dreher L, Elvers-Hornung S, Brinkmann I, Huck V, Henschler R, Gloe T, et al. Cultivation in human serum reduces adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell adhesion to laminin and endothelium and reduces capillary entrapment. *Stem Cells Dev*. 2013 Mar 1;22(5):791–803.
336. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2010 Sep;16(9):1293–301.
337. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Mesenchymal stem cells and intravital microscopy*. *Microvasc Res*. 2009 May;77(3):370–6.
338. Ramot Y, Steiner M, Morad V, Leibovitch S, Amouyal N, Cesta MF, et al. Pulmonary thrombosis in the mouse following intravenous administration of quantum dot-labeled mesenchymal cells. *Nanotoxicology*. 2010 Mar;4(1):98–105.
339. EudraLex. Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 2: Manufacture of Biological active substances and Medicinal Products for Human Use (2013). Directives 91/356/EEC, as amended by Directive 2003/94/EC, and 91/412/EEC.
340. Mareschi K, Rustichelli D, Calabrese R, Gunetti M, Sanavio F, Castiglia S, et al. Multipotent mesenchymal stromal stem cell expansion by plating whole bone marrow at a low cellular density: a more advantageous method for clinical use. *Stem Cells Int*. 2012;2012:920581.
341. Capelli C, Salvade A, Pedrini O, Barbui V, Gotti E, Borleri G, et al. The washouts of discarded bone marrow collection bags and filters are a very abundant source of hMSCs. *Cytotherapy*. 2009;11(4):403–13.

342. Menard C, Pacelli L, Bassi G, Dulong J, Bifari F, Bezier I, et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev.* 2013 Jun 15;22(12):1789–801.
343. European Pharmacopoeia. (2013). 8th edition. Strasbourg, France. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Available at <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-8th-edition-1563.html>.
344. Rustichelli D, Castiglia S, Gunetti M, Mareschi K, Signorino E, Muraro M, et al. Validation of analytical methods in compliance with good manufacturing practice: a practical approach. *J Transl Med.* 2013;11:197.
345. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L, MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy.* 2013 Sep;15(9):1054–61.
346. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* 2014 Jan;85(1):43–77.
347. 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.
348. European Pharmacopoeia. (2008). Section 2.6.27 (Microbiological Control of Cellular Products), 7th edn. Maisonneuve SA, Sainte Ruffine, France.
349. European Pharmacopoeia.(2008). Section 2.6.1 (Sterility), 7th edn. Maisonneuve SA, Sainte Ruffine, France.
350. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, DiGuseppi JL, Willert M, Mirrett S, et al. Bact/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 1990 Jul;28(7):1608–12.
351. European Pharmacopoeia. (2008). Section 2.6.14 (Endotoxin), 7th edn. Maisonneuve SA, Sainte Ruffine, France.
352. European Pharmacopoeia. (2008). Section 2.6.7 (Mycoplasma), 7th edn. Maisonneuve SA, Sainte Ruffine: France.
353. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):121–30.
354. Neri S, Bourin P, Peyrafitte J-A, Cattini L, Facchini A, Mariani E. Human adipose stromal cells (ASC) for the regeneration of injured cartilage display genetic stability after in vitro culture expansion. *PLoS One.* 2013;8(10):e77895.
355. Borghesi A, Avanzini MA, Novara F, Mantelli M, Lenta E, Achille V, et al. Genomic alterations in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells call for stringent quality control before any possible therapeutic approach. *Cytotherapy.* 2013 Nov;15(11):1362–73.
356. Hastings RJ, Cavani S, Bricarelli FD, Patsalis PC, Kristoffersson U, ECA PWG Co-ordinators. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quali-

- ty assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2007 May;15(5):525–7.
357. Barkholt L, Flory E, Jekerle V, Lucas-Samuel S, Ahnert P, Bisset L, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*. 2013 Jul;15(7):753–9.
358. Muntión S, Sánchez-Guijo FM, Carrancio S, Villarón E, López O, Diez-Campelo M, et al. Optimisation of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implications for clinical use. *Transfus Med Oxf Engl*. 2012 Apr;22(2):122–7.
359. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009 Jul;15(7):1751–61.
360. Shafiee A, Soleimani M, Chamheidari GA, Seyedjafari E, Dodel M, Atashi A, et al. Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Dec 1;99(3):467–78.
361. Lin P, Correa D, Kean TJ, Awadallah A, Dennis JE, Caplan AI. Serial transplantation and long-term engraftment of intra-arterially delivered clonally derived mesenchymal stem cells to injured bone marrow. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2014 Jan;22(1):160–8.
362. Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 2002 Aug;30(4):215–22.
363. Toonkel RL, Hare JM, Matthay MA, Glassberg MK. Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jul 15;188(2):133–40.
364. Sukpat S, Isarasena N, Wongphoom J, Patumraj S. Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress. *BioMed Res Int*. 2013;2013:459196.
365. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest*. 2013 Jun;143(6):1590–8.
366. Bonfield TL, Koloze M, Lennon DP, Zuchowski B, Yang SE, Caplan AI. Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Dec;299(6):L760–70.
367. Blanquer M, Pérez Espejo MA, Iñiesta F, Gómez Espuch J, Meca J, Villaverde R, et al. [Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2010 Dec;32 Suppl A:31–7.
368. Moraleda JM, Blanquer M, Gomez-Espuch J, Iñiesta F, Hurtado V, Perez-Espejo MA et al. Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *REVISTA DE HEMATOLOGÍA MEXICANA* 2011;12(3):144-14. 2011.
369. Bueno C, Ramirez C, Rodríguez-Lozano FJ, Tabarés-Seisdedos R, Rodenas M, Moraleda JM, et al. Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. *Cell Transplant*. 2013;22(11):2017–28.
370. Garcia Santos JM, Blanquer M, Torres del RS, Iñiesta F, Espuch JG, Perez-Espejo MA, et al. Acute and chronic MRI changes in the spine and spinal cord after surgical stem cell grafting in patients with definite amyotrophic lateral sclerosis: post-infusion injuries are unrelated with clinical impairment. *Magn Reson Imaging* 2013 Oct;31(8):1298-308.

371. Pastor D, Viso-León MC, Jones J, Jaramillo-Merchán J, Toledo-Aral JJ, Moraleda JM, et al. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motoneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev.* 2012 Jun;8(2):445–58.
372. Pastor D, Viso-León MC, Botella-López A, Jaramillo-Merchan J, Moraleda JM, Jones J, et al. Bone marrow transplantation in hindlimb muscles of motoneuron degenerative mice reduces neuronal death and improves motor function. *Stem Cells Dev.* 2013 Jun 1;22(11):1633–44.
373. Perez-Simon JA, Lopez-Villar O, Andreu EJ, Rifon J, Muntion S, Campelo MD, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica* 2011 Jul;96(7):1072-6.
374. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005 Jul;48(7):1416–23.
375. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009 Jan;52(1):79–86.
376. Sánchez PL, Sánchez-Guijo FM, Villa A, del Cañizo C, Arnold R, San Román JA, et al. Launching a clinical program of stem cell therapy for cardiovascular repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007 Feb;4 Suppl 1:S123–9.
377. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2005 May;11(5):321–34.
378. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 14;103(46):17438–43.
379. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5(6):485–9.
380. Rodríguez-Lozano F-J, Insausti C-L, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M-C, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012 Nov;17(6):e1062–7.
381. Thankamony SP, Sackstein R. Enforced hematopoietic cell E- and L-selectin ligand (HCELL) expression primes transendothelial migration of human mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 8;108(6):2258–63.
382. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the “step 2-bypass pathway” and other emerging perspectives. *Curr Opin Hematol.* 2011 Jul;18(4):239–48.
383. Sackstein R. Engineering cellular trafficking via glycosyltransferase-programmed stereosubstitution. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:193–200.
384. Sackstein R. Re: “Ex vivo fucosylation improves human cord blood engraftment in NOD-SCID IL-2Rγ(null) mice.” *Exp Hematol.* 2012 Jul;40(7):518–9; author reply 519–20.
385. Sackstein R, Dimitroff CJ. A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity. *Blood.* 2000 Oct 15;96(8):2765–74.
386. Sackstein R. Directing stem cell trafficking via GPS. *Methods Enzymol.* 2010;479:93–105.

387. Cabañas-Perianes V, López-Lucas M, García Hernández A, Martínez C, García Bernal D, Algueró C, Blanquer M, Muñoz-Esparza C, Marín N, Millan JE, Insausti C, Asín C, Molina M, Sackstein R, Moraleda JM. "Estudio Preclínico de trasplante de células mesenquimales humanas fucosiladas en el tratamiento de la osteoporosis" CO-175. LV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia y XXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Sevilla 2013.
388. García Hernández A, López Lucas MD, Cabañas-Perianes MD, Algueró C, Sanchez-Salinas D, Molina MM, Asín C, Blanquer M, Sackstein R, Moraleda JM. "Fucosylation to control cell fate. Protocol validation under GMP conditions for clinical use". European Society of Gene and Cell Therapy Meeting. Madrid 2013. Madrid, Octubre 2013. Hum Gene Ther. Dec 1, 2013; Vol. 24 (12), Pa101-pA102. P145.
389. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. Exp Hematol. 2008 Aug;36(8):1014–21.
390. Böyum A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scand J Clin Lab Investig Suppl. 1968;97:31–50.
391. Freshney RI, Freshney RI. Culture of Specific Cell Types. In: Culture of Animal Cells [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2005 [cited 2015 Oct 20]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471747599.cac023/abstract>
392. Dimitroff CJ, Lee JY, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13841–6.
393. Cabañas Perianes V. Trasplante de células mesenquimales fucosiladas en el tratamiento de la osteoporosis. Estudio preclínico y prueba de concepto [Internet]. TDR (Tesis Doctorales en Red). 2014 [cited 2015 Nov 29]. Available from: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/147274>
394. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso humano y veterinario. Capítulo 4: Documentación. Available from http://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/reqBasicosMed/07_capitulo-4b.pdf.
395. Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, et al. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. Stem Cells Dayt Ohio. 2007 Sep;25(9):2371–82.
396. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. Nat Med. 2008 Feb;14(2):181–7.
397. Stamper HB, Woodruff JJ. Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. J Exp Med. 1976 Sep 1;144(3):828–33.
398. <https://www.clinicaltrials.gov/>.
399. ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano.

400. Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.
401. Directiva 2001/20/CE de buenas prácticas en la realización de ensayos clínicos de medicamentos de uso humano.
402. López-Holgado N, López-Villar O, Sánchez-Guijo FM, del Cañizo MC. [Cell-Production Units for stem cell clinical research: basic aspects for their development and optimization]. *Med Clínica*. 2012 Jan 21;138(1):31–6.
403. Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007 Sep;92(9):1208–15.
404. Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* CII. 2000 Jun;49(3):152–6.
405. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 rev.3) (2011/C 73/01).
406. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005 Nov;205(2):228–36.
407. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):270–8.
408. Astudillo P, Ríos S, Pastenes L, Pino AM, Rodríguez JP. Increased adipogenesis of osteoporotic human-mesenchymal stem cells (MSCs) characterizes by impaired leptin action. *J Cell Biochem*. 2008 Mar 1;103(4):1054–65.
409. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J*. 1991 Feb;10(2):343–8.
410. http://www.picscheme.org/pdf/26_pi007-6recommendationonasepticprocesses.pdf.
411. Aktas M, Radke TF, Strauer BE, Wernet P, Kogler G. Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy*. 2008;10(2):203–11.
412. Zinno F, Landi F, Scerpa MC, Aureli V, Lanti A, Ceccarelli S, et al. Processing of hematopoietic stem cells from peripheral blood before cryopreservation: use of a closed automated system. *Transfusion (Paris)*. 2011 Dec;51(12):2656–63.
413. R. Saccardi, M. Blanquer, M. Boieri, C. Bucher, C. Chabannon, S. Dal Pozzo, B. Esterni, F. Lanza, C. Lemarié, M. López Lucas, D, J. Moraleda Jiménez, A. Sunnanvader, A. Tichelli, B. C“Washing of thawed PBSC graft by fully automated, clinical-grade method: results of prospective, multicentre trial” Congreso: European Group for Blood and Marrow Transplantation. Fecha: 7-10 de Abril de 2013 Lugar de Celebración: London, United Kingdom.
414. Güven S, Karagianni M, Schwalbe M, Schreiner S, Farhadi J, Bula S, et al. Validation of an automated procedure to isolate human adipose tissue-derived cells by using the Sepax® technology. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Aug;18(8):575–82.

415. Torre ML, Lucarelli E, Guidi S, Ferrari M, Alessandri G, De Girolamo L, et al. Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. *Stem Cells Dev.* 2015 Mar 15;24(6):677–85.
416. Barile MF, Grabowski MW, Kapatais-Zoumbos K, Brown B, Hu PC, Chandler DK. Experimentally induced *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in chimpanzees. *Microb Pathog.* 1993 Oct;15(4):243–53.
417. Zhang Z-X, Guan L-X, Zhang K, Wang S, Cao P-C, Wang Y-H, et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biol Int.* 2007 Jun;31(6):645–8.
418. Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011 Aug 5;9(2):97–102.
419. Sensebé L, Tarte K, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Phinney DG, et al. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell.* 2012 Jan 6;10(1):9–10; author reply 10–1.
420. Popat U, Mehta RS, Rezvani K, Fox P, Kondo K, Marin D, et al. Enforced fucosylation of cord blood hematopoietic cells accelerates neutrophil and platelet engraftment after transplantation. *Blood.* 2015 May 7;125(19):2885–92.

ANEXOS

Anexo I:

SOLICITUD DE ASESORAMIENTO CIENTÍFICO A LA AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS SOBRE UN CAMBIO DE REACTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DEL MEDICAMENTO EN INVESTIGACIÓN (ACTUALMENTE EN FASE PRECLÍNICA): CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA AUTÓLOGAS FUCOSILADAS

ÍNDICE

1. Objeto de la consulta.
2. Introducción al tema.
3. Estudios preclínicos realizados para evaluar la seguridad y eficacia de las células madre mesenquimales de médula ósea humanas fucosiladas con FT-VI.
 - 3.1. Justificación de la elección del modelo animal.
 - 3.2. Ensayos de toxicidad aguda.
 - 3.3. Ensayos de toxicidad crónica.
 - 3.4. Ensayos de tumorigenicidad.
 - 3.5. Ensayos de biodistribución.
 - 3.6. Ensayos de eficacia (prueba de concepto).
4. Argumentación del cambio de enzima: Caracterización química y biológica de FTVII y su homología con FTVI. Mecanismo de acción de FTVII y homología/diferencias con FTVI.
5. Datos sobre los resultados de FTVII en el laboratorio y en modelos in vitro, particularmente estudios comparativos entre ambas enzimas.
6. Características de fabricación de la enzima. Certificado de análisis de FTVII.
7. Conclusiones de la propuesta.

1. OBJETO DE LA CONSULTA:

Presentar a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) los datos que justifican el cambio de enzima fucosiltransferasa (FT) que se emplea en la fase final de fabricación del medicamento en investigación Células Mesenquimales humanas de médula ósea autóloga fucosiladas (CSM-MO-f) para el tratamiento de la osteoporosis. Dicho medicamento actualmente se encuentra en fase preclínica.

Se solicita valoración por parte del personal experto de la AEMPS sobre si dicha justificación se considera adecuada y suficiente.

2. INTRODUCCIÓN AL TEMA:

Nuestro grupo consiguió financiación en la convocatoria de 2011 de Ensayos Clínicos no comerciales del MSSSI, para la realización del “Ensayo clínico en fase I/II de utilización de células madre Mesenquimales de médula ósea fucosiladas en pacientes con osteoporosis establecida con fractura vertebral” (EC11-007) que se encuentra pendiente de iniciar.

Para poder realizar los estudios de fase preclínica del medicamento en investigación, presentamos a la convocatoria AES 2012-Proyectos de Investigación en Salud, la memoria del proyecto titulado “Infusión intravenosa de células Mesenquimales de médula ósea autóloga modificadas mediante fucosilación CSM-MO-f para el tratamiento de la osteoporosis. Estudio preclínico de seguridad y eficacia” (FIS PI12/00760), que resultó concedida y financiada.

Dicho proyecto, incluía la puesta a punto y comprobación de la eficacia de la técnica de fucosilación de CSM-MO humanas con FT-VI mediante estudios *in vitro* y el análisis de biodistribución, seguridad y eficacia tras la infusión de CSM-MOf en modelo de ratón inmunodeprimido NOD/SCID.

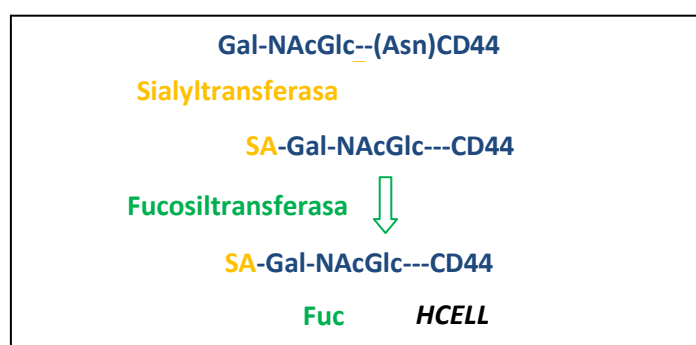
El estudio ha concluido y el análisis de los resultados demuestra la seguridad del medicamento. Dichos resultados, que han sido objeto de una tesis doctoral que se adjunta como anexo, están siendo utilizados en la elaboración del expediente de IMPD que se enviará a la AEMPS junto con el resto de información relacionada con el ensayo clínico para su aprobación a lo largo del presente mes de Mayo.

En este contexto, se ha producido un cese en el suministro de la enzima fucosiltransferasa VI (FT-VI), que ha sido sustituida por su análoga FT-VII, la cual es de más fácil purificación y mantiene la misma actividad junto con un mejor perfil de estereoespecificidad (ver más adelante).

Con motivo de este cambio de reactivo, mantuvimos una reunión presencial el día 13/12/13 en la sede de la AEMPs con el Dr Fernando Méndez Hermida del Servicio de evaluación fármaco-toxicológica del Departamento de Medicamentos de uso humano, en la que participaron por parte de nuestro grupo el Dr Jose M^a Moraleda Jiménez, el Dr Robert Sackstein y otros investigadores del equipo. El Dr. Sackstein, con quien colaboramos estrechamente, ha desarrollado en la Universidad de Harvard la técnica de fucosilación del antígeno CD44 de las células Mesenquimales para mejorar su migración a tejidos diana y explicó a los asistentes los motivos y consecuencias de emplear una u otra enzima fucosiltransferasa. En su laboratorio se han realizado los ensayos pertinentes para comprobar la equivalencia entre ambas enzimas. Por nuestra parte, hemos reproducido con FT-VII los ensayos *in vitro* realizados previamente con FT-VI y, realizando los mismos controles de calidad en proceso, hemos comprobado que conseguimos fucosilar células mesenquimales de médula ósea humana de forma eficaz con ambas enzimas.

La fabricación del medicamento consiste, brevemente, en: expansión *in vitro* de CSM de médula ósea autólogas según protocolo habitual (en nuestro caso con adición al medio de lisado plaquetario, sin empleo de derivados de origen animal) y tras despegarlas en pase 3-4, incubación de las mismas a 37°C con la enzima fucosiltransferasa y su sustrato, en un medio tamponado que protege la viabilidad celular. Tras finalizar la incubación, se realizan lavados para eliminar posibles trazas de enzima y las células se resuspenden en solución salina fisiológica y se envasan para su administración al paciente.

La fucosilación, a nivel molecular, consiste en la adición de una molécula de fucosa en posición alfa-(1,3) al azúcar N-acetilglucosamina presente en una unidad terminal de lactosamina tipo 2 que posee el antígeno de membrana CD44 de las células mesenquimales.



Con la adición de este azúcar, CD44 se convierte en *HCELL*, que es un potente ligando de E-selectina, lo que permitirá que las células mesenquimales puedan migrar de forma más efectiva al tejido óseo donde ésta se expresa.

Se trata de una modificación transitoria, de manera que la expresión de *HCELL* en las células fucosiladas se mantiene estable durante 24 horas, haciéndose progresivamente indetectable en torno a las 72-96 horas, debido al propio *turnover* de la proteína de superficie.

Como se desarrolla más adelante, tanto FT-VI como FT-VII son capaces de llevar a cabo esta reacción, con incluso ventajas de estereo-especificidad y pureza para FT-VII.

Se trata por tanto de un cambio en un reactivo empleado en una de las últimas etapas del proceso de fabricación del medicamento en investigación, que no se acompaña de cambios en la actividad ni las especificaciones establecidas para el producto final. Abre la posibilidad de que existan dos "reactivos", lo que siempre es positivo para la cadena de trabajo y proporciona además mayor disponibilidad de proveedores, lo que también podría, en consecuencia, abaratar costos.

3. ESTUDIOS PRECLINICOS REALIZADOS CON FT-VI:

Para probar la seguridad de la infusión de células mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas, hemos realizado un estudio prospectivo analítico de tres brazos, con infusión intravenosa del medicamento a través de la vena caudal de ratones NOD/SCID de ambos

sexos. En el primer brazo (n=13) infundimos a los ratones 1×10^6 células stem mesenquimales humanas fucosiladas, en el segundo brazo (n=14) infundimos 1×10^6 células stem mesenquimales humanas sin fucosilar para comparar perfil de seguridad, anidamiento y formación ósea y en el tercero y último (n=4) se infundió suero salino fisiológico (SSF) al 0,9% como grupo control. El estudio completo, se adjunta en forma de tesis doctoral como anexo I.

Las conclusiones de los ensayos realizados son, de forma resumida:

1. La fucosilación ex vivo de Células Mesenquimales de médula ósea humanas con FT-VI se ha implantado de forma exitosa en nuestro centro.
2. La fucosilación ex vivo no modifica las características biológicas intrínsecas de las Células Stem Mesenquimales manteniendo éstas su integridad morfológica, inmunofenotípica, funcional y citogenética.
3. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales fucosiladas mostró un perfil de seguridad óptimo en los ratones NOD/SCID, con iguales resultados en términos de bienestar animal, parámetros hemáticos y bioquímicos en suero y una menor frecuencia de alteraciones histológicas que los infundidos con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar o con suero salino fisiológico.
4. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales fucosiladas asoció mayor número de ratones NOD/SCID con osteoblastos osteocalcina humano positivos y una mayor osteoblastogénesis cuantitativa que los infundidos con Células Stem Mesenquimales sin fucosilar o suero salino fisiológico.
5. La biodistribución de las Células Stem Mesenquimales fucosiladas, evaluada mediante reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción, fue normal, sin objetivarse expresión de ARNm humano en corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, gónadas, sistema nervioso central ni sangre periférica de los ratones NOD/SCID.
6. La infusión intravenosa de Células Stem Mesenquimales en ratones NOD/SCID es segura y eficaz en el modelo murino NOD/SCID por lo que puede convertirse en una herramienta útil para el tratamiento de la osteoporosis en humanos.

4. ARGUMENTACIÓN DEL CAMBIO DE ENZIMA: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE FTVII Y SU HOMOLOGÍA CON FTVI. MECANISMO DE ACCIÓN DE FTVII Y SUS DIFERENCIAS CON FTVI.

El cambio de enzima, que se realiza como consecuencia de un cese en el suministro (al menos temporal) de FT-VI, no tiene efectos deletéreos sobre el proceso de fabricación y la calidad del producto, dado que ambas enzimas consiguen la misma modificación, tal y como se explica a continuación.

Las enzimas FTVI y FTVII pertenecen al mismo tipo de glicosiltransferasas conocidas como “ α -(1,3) fucosiltransferasas” que catalizan la unión en posición α -(1,3) de la fucosa a un azúcar N-acetilglucosamina presente en una unidad terminal de lactosamina tipo 2: Gal- β (1,4)-GlcNAc-R (siendo “R” una cadena de polilactosamina). Ambas enzimas tienen estereoespecificidad para llevar a cabo la α -(1,3) fucosilación y comparten el 43% de homología en su secuencia peptídica (Sasaki K, et al. “Expression of Cloning of a Novel α -(1,3)-Fucosyltransferase that is Involved in Biosynthesis of the Sialyl Lewis X Carbohydrated Determinant in Leukocytes”. *J Biological Chemistry* 269:14730-737, 1994).

Tanto FTVI y FTVII producen exclusivamente α -(1,3) fucosilación, sin embargo FTVII sólo es capaz de fucosilar la N-acetilglucosamina cuando ésta se encuentra dentro de una cadena de lactosamina tipo 2 que posee un ácido neuramínico terminal (“NeuAc”) conocido también como ácido siálico, en posición α -(2,3) de la galactosa terminal: NeuAc- α (2,3)-Gal- β (1,4)-GlcNAc-R (esta estructura es conocida como “lactosamina sializada”). Cuando esta reacción ocurre, se forma un tetrasacárido llamado “sialyl Lewis X” (sLex): NeuAc- α (2,3)-Gal- β (1,4)-[Fuc- α (1,3)]GlcNAc-R).

FTVI puede fucosilar la N-acetilglucosamina cuando se encuentra en un residuo terminal de lactosamina tipo 2 tanto no sializado como sializado. Cuando se fucosila una lactosamina no sializada, se crea el trisacárido conocido como “Lewis X” (Lex): Gal- β (1,4)-[Fuc- α (1,3)] GlcNAc-R).

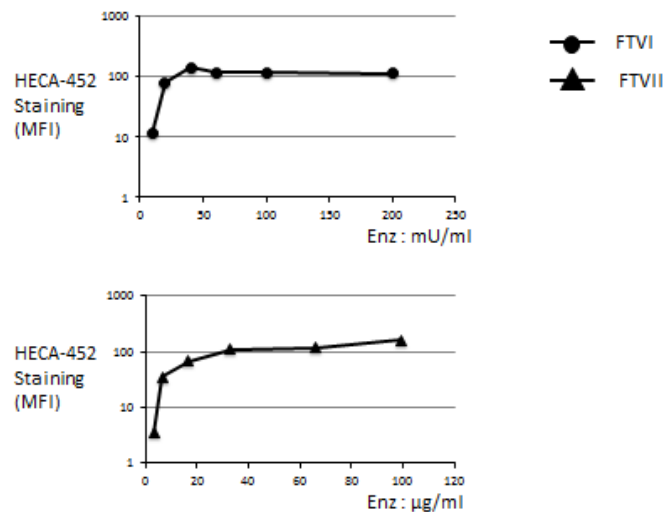
Así, dado que FTVII sólo puede fucosilar la lactosamina tipo 2 sializada, únicamente dará lugar a sLex, mientras que FTVI puede crear tanto sLex como Lex. La estructura sLex es el ligando por excelencia de E-selectina mientras que Lex carece de la función de ligar dicha proteína. Por tanto, FTVII es más específica en la producción enzimática de determinantes de unión a E-selectina que FTVI, ya que la primera está especializada en producir sólo sLex (Sackstein R. “Glycosyltransferase-Programmed Stereosubstitution to Create HCELL: Engineering a Roadmap for Cell Migration”. *Immunological Reviews* 230:51-74, 2009).

5. DATOS SOBRE LOS RESULTADOS DE FTVII EN EL LABORATORIO Y EN MODELOS PRECLÍNICOS, PARTICULARMENTE ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE AMBAS ENZIMAS.

Para los estudios in vitro realizados hasta ahora, las enzimas FTVI y FTVII empleadas han sido suministradas por dos proveedores distintos, que utilizan métodos propios para determinar la actividad de cada enzima. FTVI se suministra en unidades de actividad mientras que FTVII se suministra en unidades de concentración (mg/ml). Dado que ninguno de los proveedores proporciona enzima al otro para poder calcular su equivalencia, en el laboratorio del Dr Sackstein, se ha efectuado una curva de dosis-respuesta para normalizar los niveles de enzima necesarios para la reacción utilizando FTVI y FTVII, buscando establecer la eficacia de cada enzima en la producción de sLex en la superficie de las células madre mesenquimales humanas (MSCs) tratando en mismo número de células (20 millones de células por mililitro). También demostraron que ninguna de ellas necesita Manganeso (ión altamente tóxico) para llevar a cabo la exofucosilación de la superficie celular.

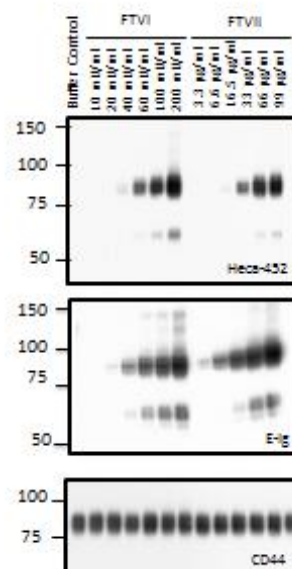
En la figura 1 pueden verse los niveles de expresión de sLex en la superficie celular con cada enzima. Por citometría de flujo se observa una meseta de intensidad media de fluorescencia (MFI) de 100 para cada enzima medida con el anticuerpo monoclonal HECA452 que detecta sLex.

Fig. (1) Comparison of sLex production by FTVI and FTVII on the MSC Surface

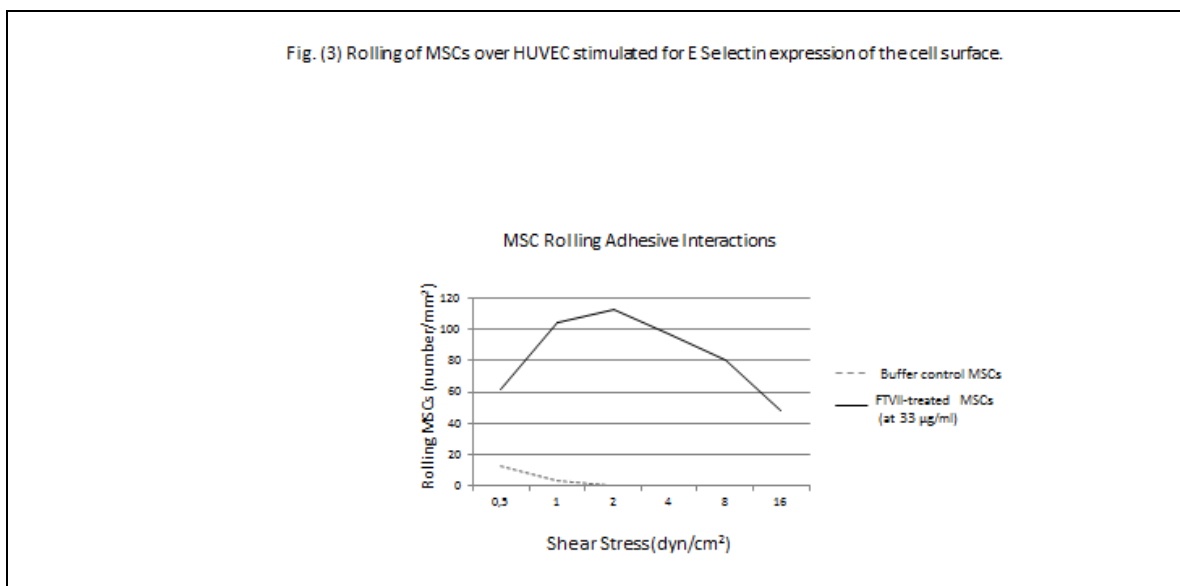


La figura 2 muestra el western blot de lisados celulares de células mesenquimales humanas tratadas con FTVI y FTVII. Usamos el anticuerpo monoclonal HECA452 para medir la expresión de sLex y una inmunoglobulina quimérica de E-selectina para medir la expresión del ligando de E-selectina. Se observó que tanto FTVI como FTVII crean de manera similar la estructura sLex (medido con HECA452) y confieren actividad ligando de E-selectina a la estructura CD44 de las células mesenquimales. El inmunoblot de la parte inferior es un control de la expresión de CD44, mostrando que todos los extractos tienen el mismo nivel de CD44.

Fig. (2) Comparison of HCELL production in MSC with FTVI-treatment and FTVII-treatment



Como se muestra en la figura 3, también se realizaron ensayos de adhesión bajo condiciones de flujo hemodinámico. Se observó que las células mesenquimales humanas tratadas con FTVII tienen gran capacidad de unión a la E-selectina expresada en las células endoteliales humanas dentro del rango de flujo fisiológico (1-4 dinas/cm²). Por tanto, FTVII es un potente catalizador de la formación de HCELL en la superficie de las células mesenquimales humanas.



6. CARACTERÍSTICAS DE FABRICACIÓN DE LA ENZIMA. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE FTVII

La mayor ventaja de FTVII con respecto a FTVI, es que FTVII es producida en células CHO como una proteína marcada con histidinas en su carbono terminal y puede ser purificada a partir de sobrenadantes de cultivos por cromatografía en columna de níquel. FTVI era producida en levaduras (*Pichia pastoris*) y no contenía marcas de histidina, por lo tanto, FTVI sólo podía ser purificada por cromatografía de intercambio iónico, y como tal, la pureza de la proteína no superó nunca el 85%. Como se muestra en las hojas adjuntas del proveedor (R&D Systems), la enzima se resuspende en solución salina estéril equilibrada de Hans (HBSS), la pureza es superior al 95% con niveles de endotoxinas <2,5 UE/ml y los análisis microbiológicos no muestran contaminación fúngica o bacteriana. (ver Anexo II).

7. CONCLUSIONES DE LA PROPUESTA:

La enzima FTVII cumple o supera todas las características de FTVI, con la ventaja adicional de que se puede purificar más fácilmente gracias a la incorporación de una secuencia de histidinas en el extremo C-terminal. El uso de FTVII no tiene efectos deletéreos sobre el proceso de fabricación y la calidad del producto y nos permite ser versátiles en situaciones como la actual de problemas de suministro (al menos temporal) de FT-VI.

En el presente documento, mostramos que los estudios preclínicos de seguridad y eficacia de la infusión intravenosa de células Mesenquimales de médula ósea humanas modificadas mediante fucosilación con FT-VI en modelo murino NOD/SCID han demostrado seguridad (Anexo I).

Dada la homología entre FT-VI y FT-VII, con ventajas en cuanto a especificidad y pureza para FTVII, nuestra posición es la de poder validar ambas enzimas en condiciones GMP para la fabricación del medicamento en investigación “células mesenquimales de médula ósea humana fucosiladas”.

Planteamos una alternativa equivalente en cuanto a calidad y eficacia en un reactivo empleado durante la fase final del proceso de fabricación del medicamento en investigación, que no se acompaña de cambios en la actividad ni las especificaciones establecidas para el producto final. Abre la posibilidad de que existan dos "reactivos", lo que siempre es positivo para la cadena de trabajo y proporciona además mayor disponibilidad de proveedores, lo que también podría, en consecuencia, abaratar costos

Agradeceremos la revisión de esta propuesta por parte de la Agencia reguladora correspondiente (AEMPS), así como conocer los comentarios u objeciones que pudiesen surgir tras la misma.

Anexo II

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (MÉDULA ÓSEA) PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

En el proceso de donación de muestras biológicas será de aplicación la Ley 14/2007 de 3 Julio de Investigación Biomédica y conforme a la cual, previa a la firma del consentimiento para la utilización de una muestra biológica con fines de investigación biomédica recibirá la información que se detalla en el capítulo III de la ley citada referente a la finalidad, beneficios esperados, posibles inconvenientes, identidad del responsable, derecho de revocación del consentimiento, lugar de realización de los análisis y destino de las muestras, derecho a conocer los datos genéticos, garantías de confidencialidad, conservación de los datos y muestras, acceso a datos y derecho a no ser informado. Para ello se le entrega una hoja de información sobre la donación de muestras biológicas que podrá leer detenidamente así como preguntar las dudas que le surjan previo a la firma del consentimiento específico para dicha donación.

El procedimiento que se le propone a usted como paciente de traumatología, que va a ser intervenido quirúrgicamente bajo anestesia general o raquianestesia, consiste en donar voluntariamente médula ósea sin que la obtención de ésta le suponga dolor alguno ni interfiera con el manejo habitual de su patología quirúrgica. Dicha muestra biológica (médula ósea) será utilizada en el proyecto de investigación biomédica titulado: ***“Validación de la obtención de células mononucleadas de médula ósea asociada a la puesta en marcha de ensayos clínicos de terapia celular”*** que está siendo realizado por el equipo de investigación coordinado por el Dr. José M. Moraleda Jiménez, en la Unidad de Producción Celular del Servicio de Hematología y Hemoterapia y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HCUVA).

OBJETIVO

El avance de la ciencia y de la medicina exige la realización de investigación sobre muestras humanas, ya sea de donantes sanos o de enfermos.

Se solicita su participación en este proyecto de investigación consistente en aislar células madre localizadas en la médula ósea, que le serán extraídas durante el transcurso de la intervención quirúrgica de su patología de base.

Las células de nuestro organismo, en mayor o menor medida, están en continuo proceso de renovación. Esta renovación incluye la sustitución de células dañadas y/o muertas por células nuevas; esto hace que los tejidos mantengan su estructura y función de manera adecuada. Este proceso de renovación se realiza a partir de células madre que son capaces de diferenciarse hacia distintos tipos celulares según las necesidades del tejido dañado. Las células madre se localizan en muchos tejidos (hueso, cartílago, tejido adiposo...) así como en la médula ósea, siendo éste su reservorio principal.

Se pretende validar la obtención de las células mononucleadas de médula ósea con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la biología de las células madre, y que los avances obtenidos puedan trasladarse lo antes posible a la práctica clínica con la puesta en marcha de ensayos clínicos de terapia celular.

En ningún momento se utilizará la muestra con otra finalidad distinta a la mencionada.

¿CÓMO SE REALIZA LA DONACIÓN DE MÉDULA ÓSEA?

La donación de médula ósea se realizará en el quirófano de traumatología del HCUVA una vez anestesiado el paciente y preferentemente antes de la intervención de su patología quirúrgica, si las condiciones de quirófano lo permiten. El procedimiento de extracción que normalmente dura menos de 15 minutos será realizado por hematólogos de la Unidad de Terapia Celular mediante punción de la cresta ilíaca (hueso de la pelvis) del paciente, ya anestesiado para la intervención de su patología traumática, por lo que son totalmente indoloras. La cantidad de médula ósea que se extraerá será de 50 ml.

Una vez otorgado su consentimiento y obtenida la muestra habrá concluido su participación en el proyecto y no se le exigirá que dedique ningún tiempo extra al mismo.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS GENERALES DE LA DONACIÓN DE MÉDULA ÓSEA?

La muestra de médula ósea que se le va a extraer no forma parte del protocolo habitual de actuación médica para su patología de base, pero no se esperan riesgos especiales añadidos por su participación en este estudio.

La experiencia de miles de donaciones de médula ósea efectuadas en el mundo demuestra que el procedimiento no comporta daño o merma alguna. Existen unos riesgos mínimos ligados al procedimiento, menos del 0.5 por 100, como son la aparición de un pequeño hematoma en los sitios de punción, la posibilidad de infección en los sitios de extracción y raramente, lesiones de algún tejido local (durante la extracción de la sangre medular es posible provocar daños locales a los tejidos causando, por ejemplo, ciatalgia).

El organismo no advierte ningún síntoma por la carencia de esta médula, que se recupera en unos días. Aunque es posible que en los 2-3 días posteriores a la extracción, usted presentara dolor local en la zona de punción, no es necesario tomar ningún analgésico adicional al estar contemplado en tratamiento que le prescriba el traumatólogo por su patología de base.

BENEFICIOS ESPERADOS Y COMPENSACIÓN

Tal como recoge la Ley de Investigación Biomédica de 3 de Julio de 2007, “La donación y la utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, cualquiera que sea su origen específico, sin que en ningún caso las compensaciones que se prevén en la ley tengan un carácter lucrativo o comercial. La donación implica, así mismo, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras biológicas”.

Los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pretenden ayudar al avance médico y no se espera que le beneficie a usted directamente. Sin embargo, esta información ayudará a investigar las propiedades de las células madre, por lo que en el futuro, en caso de resultar positivas, tanto usted como otras personas podrían beneficiarse.

No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial.

La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

La titularidad de los resultados de la investigación realizada con las muestras corresponderá a los investigadores responsables.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico/tratamiento y/o seguimiento.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, se procederá a la destrucción inmediata de la parte de las muestras que no se haya utilizado en la investigación, sin perjuicio de la conservación de los datos resultantes de las investigaciones que se hubiesen realizado con carácter previo.

¿A QUIÉN PUEDO PREGUNTAR EN CASO DE DUDA?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para donación de muestras biológicas (médula ósea).

Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto de la donación y sus implicaciones contactando con el investigador principal del proyecto, el Dr. José M. Moraleda Jiménez en el teléfono 968 369532.

CONFIDENCIALIDAD

Los investigadores responsables de la investigación se comprometen a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos que participen en el estudio, de conformidad a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

Toda la información que se obtenga de analizar las muestras será considerada confidencial y tratada en consecuencia.


Para garantizar el anonimato de su identidad (asegurar que la información de su muestra de médula ósea no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada desde el momento mismo de la extracción con un código, no con su nombre. Sólo este código, y nunca su identidad, aparecerá donde figure la información clínica referida a usted. La relación entre su código y su identidad quedará custodiada por alguna persona autorizada del equipo investigador, adoptándose medidas estrictas para que tal información no esté disponible más que para este personal autorizado, que en ningún caso podrá desvelar su identidad a terceros. Así, podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras biológicas será confidencial.

Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE LA DONACIÓN

Anexo III

HARVEST DE MÉDULA OSEA

AYUDANTE	<p>Preparar mesa de quirófano estéril con:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 agujas de aspirado de médula ósea. ▪ 2 duquesitas abiertas. ▪ Verter con jeringa de 10ml y aguja gruesa el contenido de 2 viales de heparina 5% en una de las duquesitas. ▪ Con la misma aguja gruesa purgar 8 jeringas estériles de 10 cc con la heparina que hemos vertido en la duquesita y cargarlas con 0.5 ml de heparina, depositándolas sobre la mesa. ▪ Abrir una bolsa de transferencia de 150 ml, sellándole el tubular con un nudo y acoplarle un SSC con una llave de 3 pasos que debe permanecer cerrada en todo momento excepto cuando se vaya a introducir la médula ósea. ▪ Si el paciente está únicamente sedado, cargar 2 jeringas con anestésico local (mepivacaína) 	
HEMATÓLOGOS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Con el paciente en decúbito prono, desinfectar la zona de punción con betadine en abundancia. ▪ Poner anestesia local si precisa. ▪ Puncionar y aspirar enérgicamente las crestas ilíacas para obtener un máximo de 3 ml por plano mientras se gira el trócar. Cambiar de plano profundizando el punto de punción mediante el giro de la aguja sobre su eje o bien, cambiar a un nuevo punto de punción ósea, empleando si es posible el mismo orificio cutáneo. ▪ Una vez finalizado el procedimiento, describirlo en el parte de quirófano, que quedará incluido en la historia clínica del paciente según práctica habitual. 	
AYUDANTE	<p>Una vez obtenidos 10ml por jeringa, se agitará para obtener homogeneización de la misma y se pasará al ayudante de quirófano que verterá el contenido en la bolsa de transferencia a través de la llave de 3 pasos. El ayudante debe agitar continuamente la bolsa para evitar coágulos.</p> <p style="text-align: center;">Una vez recolectada la médula se ocluirá la llave de 3 pasos mediante un tapón estéril. La bolsa externa (bolsa de nutrición) se doblará sobre la que está en contacto con las células.</p> <p>Dicha bolsa se introduce a su vez envuelta en un paño estéril con pegatina identificativa de la muestra</p>	