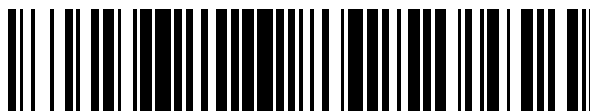


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 034**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06840316 .1**
96 Fecha de presentación: **19.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1976975**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **Expansión in vitro de células derivadas postparto en frascos rotatorios**

30 Prioridad:
19.12.2005 US 751550 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2012

73 Titular/es:
**ETHICON, INC. (100.0%)
ROUTE 22 WEST, ROUTE 151
SOMERVILLE, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:
HARMON, ALEXANDER M.

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 391 034 T3

DESCRIPCIÓN

Expansión in vitro de células derivadas postparto en frascos rotatorios

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en líneas generales al cultivo y expansión de células de mamífero. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos para el cultivo y expansión *in vitro* de células derivadas postparto en recipientes tales como frascos rotatorios.

Antecedentes de la invención

- 10 Los productos comerciales de terapia celular se producen preferiblemente en sistemas asépticos que están cerrados. Sin embargo, el cultivo de muchas líneas celulares usadas para productos comerciales de terapia celular es dependiente de anclaje. Aunque los reactores de tanque agitados, los frascos agitadores, frascos de centrifugado, reactores de sustentación, y similares, son todos útiles para células que se cultivan en suspensión (por ejemplo, hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales, muchas células usadas para tecnología de ADN recombinante, y la mayoría de los cultivos de células de insecto), las opciones para cultivar y expandir células dependientes de anclaje o preferentes de anclaje son más limitadas.

- 15 Entre las células dependientes de anclaje se incluyen muchas cepas de células diploides normales, así como la mayoría de las líneas celulares primarias. Las opciones para la producción a gran escala de dichas células incluyen frascos rotatorios, lechos de fibra y sistemas de fibras huecas, sistemas de cultivo multiplaca o de placas apiladas, cubos celulares, y microvehículos, cada uno de los cuales tiene ventajas y desventajas.

- 20 Los procedimientos basados en frascos rotatorios de cultivo celular son probablemente los procedimientos más habitualmente usados para cultivar células dependientes de anclaje y preferentes de anclaje. Los frascos rotatorios son esencialmente recipientes cilíndricos, de vidrio o plástico, que están al menos parcialmente cargados con un medio de cultivo. Los frascos rotatorios más modernos están hechos de un material plástico desechable. Los frascos se colocan en un aparato que se gira, causando que los frascos "rueden" continuamente o giren a una velocidad típicamente constante entre aproximadamente 5 y 250 revoluciones por hora. El movimiento rotatorio permite que las células, que se adhieren a las superficies interiores del frasco, se bañen en el medio mientras se tiene un amplio intercambio de gases con la atmósfera en los frascos.

- 25 Los frascos rotatorios están disponibles en varios tamaños, proporcionando cada tamaño una cantidad fija de área superficial y volumen. Muchos frascos están disponibles en el intervalo de volumen de 1-2 litros. Dos frascos rotatorios comerciales de dimensiones habituales proporcionan 850 cm² y 1050 cm², respectivamente. Para algunas aplicaciones, el gran tamaño puede ser una limitación ya que los frascos rotatorios que son demasiados grandes son difíciles de manipular cuando la seguridad microbiológica es crítica. Más recientemente los frascos rotatorios con superficies interiores expandidas han llegado a estar disponibles en el mercado para ayudar a abordar la cuestión. La manipulación de los cultivos en frasco rotatorio, tales como las manipulaciones para el subcultivo, debe minimizarse cuando sea posible.

- 30 Los sistemas de cultivo basados en frascos rotatorios proporcionan muchas ventajas incluyendo un coste relativamente bajo para el equipo y la configuración, la facilidad relativa de configuración, y la capacidad de aumentar o disminuir en escala de acuerdo con las necesidades. Los frascos, que típicamente son transparentes, permiten una inspección visual y microscópica de las células y el cultivo. Las muestras contaminadas son fáciles de detectar y pueden desecharse.

- 35 Los inconvenientes potenciales incluyen el nivel relativamente elevado de habilidad necesaria para la siembra, transferencias, recolección de las células o productos biológicos producidos, y otra manipulación en curso de las células. Los costes asociados con las operaciones en curso pueden ser elevados a causa del nivel de habilidad requerido. El riesgo de contaminación es relativamente elevado a causa de la cantidad de manipulación requerida. No obstante, a pesar de los inconvenientes potenciales, los frascos rotatorios aun se usan, incluso para la producción comercial de algunos productos biológicos.

- 40 Entre los factores que deben considerarse en el uso de frascos rotatorios para el cultivo celular está la eficacia de adherencia, así como el tiempo para alcanzar la confluencia, los parámetros de cultivo de las células adheridas incluyendo la densidad obtenible máxima por área superficial unitaria, las técnicas de desprendimiento; que son necesarias, y la eficacia del desprendimiento, la capacidad de cambiar la escala de las condiciones de cultivo, así como la homogeneidad del cultivo en condiciones aumentadas en escala, y la capacidad de aumentar en escala satisfactoriamente los procedimientos de desprendimiento. Algunas de estas consideraciones pueden verse influidas por los parámetros de inoculación (tales como velocidad de rotación, volumen de medio), las condiciones de cultivo tales como la velocidad de rotación de los frascos, así como la densidad de siembra del cultivo inicial, el volumen de medio usado con relación al área superficial y/o forma del frasco, y la cantidad de tiempo que se incuba el cultivo.

- 55 También es importante, particularmente en las aplicaciones terapéuticas celulares, que las características de las células cultivadas en condiciones de frasco rotatorio aumentadas en escala sean aquellas del tipo celular deseado

en términos de marcadores superficiales, expresión génica, viabilidad (más del 70 al 80%), y similares.

Existe la necesidad de intentar optimizar los parámetros de cultivo controlables para mejorar los sistemas de cultivos en frasco rotatorio en términos de maximizar simultáneamente la tasa de crecimiento, la cantidad de duplicación de la población conseguida, y las células totales disponibles para recoger.

5 **Sumario de la invención**

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos para maximizar simultáneamente la tasa de duplicación, la densidad de recolección, y la cantidad total de duplicación de la población para células postparto en un sistema de cultivo de frasco rotatorio. Estos procedimientos también se refieren en este documento como optimización del sistema de cultivo de frasco rotatorio para los parámetros anteriores. Los procedimientos preferiblemente comprenden usar una velocidad de rotación de aproximadamente 0,65-0,9 rpm, usando al menos aproximadamente 300 ml de medio de cultivo en un frasco de cultivo de 850 cm²; usar una densidad de siembra de menos de aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado; e incubar durante entre aproximadamente 5,5 a 6,5 días.

Los procedimientos anteriores son particularmente útiles cuando las células postparto son células derivadas de cordón umbilical, y las células postparto actualmente preferidas son aquellas que son sustancialmente similares, o incluso idénticas a ATCC NOS PTA-6067 y PTA-6068.

Estos y otros aspectos de la invención se describirán con referencia a los ejemplos, figuras, y descripción detallada de los diversos aspectos de la invención que están a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Velocidad de rotación óptima calculada (1,0 rpm), volumen de medio (112 ml), densidad de siembra (2500 células/cm²), y días en cultivo (6,27 días) para conseguir la duplicación máxima de población (3,04). La línea negra en cada gráfico representa los valores dibujados de los niveles de factor (bajo a elevado a lo largo del eje x) frente a la duplicación de la población (mínimo a máximo a lo largo del eje y). La línea azul representa el valor máximo único del eje y para los cuatro gráficos. La línea roja representa el punto en el eje x que el valor dibujado de los niveles de factores frente al valor de duplicación de la población (línea negra) intersecta con el valor máximo único del eje y (línea azul) definiendo de este modo el nivel de factor óptimo.

Figura 2: Velocidad de rotación óptima calculada (0,92 rpm), volumen de medio (300 ml), densidad de siembra (2500 células/cm²), y días en cultivo (5 días) para conseguir las horas mínimas por duplicación de población (29,71). La línea negra en cada gráfico representa los valores dibujados de los niveles de factor (bajo a elevado a lo largo del eje x) frente a la duplicación de la población (mínimo a máximo a lo largo del eje y). La línea azul representa el valor máximo único del eje y para los cuatro gráficos. La línea roja representa el punto en el eje x que el valor dibujado de los niveles de factores frente a horas por el valor de duplicación de población (línea negra) intersecta con el valor máximo único del eje y (línea azul) definiendo de este modo el nivel de factor óptimo.

Figura 3: Velocidad de rotación óptima calculada (0,98 rpm), volumen de medio (300 ml), densidad de siembra (10000 células/cm²), y días en cultivo (6,67 días) para conseguir la densidad máxima de recolección (células/cm²) (3,59E+04). La línea negra en cada gráfico representa los valores dibujados de los niveles de factor (bajo a elevado a lo largo del eje x) frente a la duplicación de la población (mínimo a máximo a lo largo del eje y). La línea azul representa el valor máximo único del eje y para los cuatro gráficos. La línea roja representa el punto en el eje x que el valor dibujado de los niveles de factores frente a la densidad máxima de recolección (línea negra) intersecta con el valor máximo único del eje y (línea azul) definiendo de este modo el nivel de factor óptimo.

Figura 4: Velocidad de rotación óptima calculada (0,705 rpm), volumen de medio (300 ml), densidad de siembra (2500 células/cm²), y días en cultivo (6,1 días) para conseguir las horas mínimas/duplicación de población (38,07 horas), duplicaciones máxima de población (3,17), y densidad de recolección máxima (células/cm²) (1,8E+04). La línea negra en cada gráfico representa los valores dibujados de los niveles de factor (bajo a elevado a lo largo del eje x) frente a la duplicación de la población (mínimo a máximo a lo largo del eje y). La línea azul representa el valor máximo único del eje y para los cuatro gráficos. La línea roja representa el punto en el eje x que el valor dibujado de los niveles de factores frente al valor de respuesta (línea negra) intersecta con el valor máximo del eje y para la duplicación de población y la densidad de recolección y el valor del eje y mínimo para las horas por duplicación de población (línea azul) definiendo de este modo el nivel de factor óptimo.

Figura 5: Duplicaciones de población frente a días en cultivo en la línea celular umbilical 050604B expandida del pase seis al pase nueve en condiciones de cultivo en frasco rotatorio optimizadas.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

La invención proporciona procedimientos para maximizar la cantidad de células dependientes de anclaje disponibles para recoger a partir de una población de células cultivadas en un sistema de cultivo de frascos rotatorios, la tasa de crecimiento de dicho cultivo y la cantidad total de duplicaciones de dicho cultivo. La invención proporciona

procedimientos para maximizar simultáneamente los tres parámetros anteriores. También se proporcionan en este documento las células y poblaciones de células producidas por los procedimientos anteriores.

Los sistemas de cultivos en frascos rotatorios son conocidos en la técnica del cultivo celular. Como se usa en este documento, los sistemas de cultivo en frasco rotatorio comprenden al menos una línea celular de interés, medio de cultivo, frasco rotatorio, un aparato para rotar los frascos, y un medio para recoger las células. El medio de cultivo comprende preferiblemente un medio basal, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), DMEM Avanzado, F12 de Ham, o combinaciones de los mismos, por ejemplo DMEM:F12 1:1. El medio puede suplementarse con suero, por ejemplo, en algunas realizaciones el medio se suplementa con suero bovino fetal (FBS) o suero de ternera recién nacida (NCS). El contenido de suero puede variar en la concentración de 0 (un medio sin suero) al 20% del volumen total del medio. Pueden usarse factores de crecimiento, por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y otros, o combinaciones de los mismos para suplementar el medio de cultivo. Los medios que contienen suero o sin suero pueden ser con o sin suplementación con factores de crecimiento.

Los sistemas de cultivo en frasco rotatorio típicamente comprenden además un medio para controlar la temperatura durante la incubación, así como un medio para manipular de forma aséptica los cultivos, por ejemplo, durante la siembra inicial de los frascos con células, o durante las transferencias posteriores. La recolección de las células puede conseguirse a través de tratamiento enzimático tal como con tripsina, tripsina-EDTA, dispasa, y colagenasa, u otras enzimas o combinaciones de enzimas con o sin otros componentes. Pueden utilizarse otros productos comerciales tales como, aunque sin limitación, TrypLE™ Express (Gibco, Inc.). Las células también pueden recogerse por operaciones manuales incluyendo, por ejemplo, centrifugación por lotes, o la recolección puede ser automatizada.

Actualmente los procedimientos para maximizar la cantidad de células disponibles para su recolección se aplican preferiblemente a células derivadas postparto, particularmente células derivadas de la placenta o el cordón umbilical. Las células del tipo preferido aquí se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos N°: 10/877.446 (células derivadas de placenta) y 10/877.012 (células derivadas de cordón umbilical), cada una presentada el 25 de junio de 2004. También se prefieren células de los tipos disponibles en la American Type Culture Collection con los números de acceso a la ATCC PTA-6067; PTA-6068; PTA-6074; PTA-6075; o PTA-6079. Son particularmente preferidas para los presentes procedimientos dirigidos a procedimientos maximizados u optimizados para cultivar células derivadas de cordón umbilical, por ejemplo, los números de acceso a la ATCC PTA-6067 y PTA-6068.

En uno de sus varios aspectos, la invención proporciona procedimientos para maximizar la cantidad de duplicaciones de la población que se puede conseguir para una población de células cultivadas en un sistema de cultivo de frasco rotatorio. Preferiblemente, las células son células derivadas postparto, e incluso más preferiblemente las células son células derivadas de cordón umbilical. En una realización actualmente preferida, las células son el número de acceso a la ATCC PTA-6067 o PTA-6068.

Las variables independientes que se han usado para maximizar la cantidad de duplicaciones de la población que se puede conseguir en un cultivo en frasco rotatorio son la velocidad de rotación, la densidad de siembra de las células en los frascos, el tiempo de incubación, y el volumen de medio colocado en el frasco. En este documento y en toda las realizaciones ejemplificadas, estas variables independientes se han ensayado, por razones de practicidad, dentro de ciertos intervalos. Los especialistas en la técnica apreciarán que podrían ensayarse rutinariamente otros valores fuera de los intervalos ensayados usando la misma metodología, y estos valores puede que demuestren ofrecer aumentos graduales en la cantidad de duplicaciones de la población. La respuesta máxima de la variable dependiente, aquí la cantidad de duplicaciones de la población conseguida se mide como función de estos parámetros y las realizaciones no ejemplificadas específicamente en este documento se contemplan como parte de esta divulgación.

Para ayudar a maximizar la variable dependiente como una función de las cuatro variables independientes, se usó un análisis de regresión. En particular, la metodología de superficie de respuesta (RSM) es actualmente un enfoque preferido para optimizar los parámetros de cultivo celular. Las aplicaciones de RSM a técnicas de optimización son conocidas en la técnica. La RSM permite la optimización de múltiples parámetros independientes para conseguir una respuesta deseada u óptima. Pueden determinarse de forma precisa los conjuntos de parámetros que proporcionan respuestas máximas y mínimas usando RSM.

Como puede observarse a partir de los datos ejemplificados en este documento y a continuación, las variables independientes ensayadas pueden afectar de forma reproducible a la cantidad máxima de duplicaciones de la población. Por tanto, el análisis estadístico de los datos permite a un especialista en la técnica determinar el valor óptimo para cada una de las cuatro variables independientes para maximizar la cantidad de duplicaciones.

En una realización preferida, por lo tanto, los frascos se llenan con aproximadamente 300 ml de medio de cultivo. Como puede observarse a partir de la Figura 1, realizaciones en las que la siembra es en un extremo incluso inferior del intervalo ensayado-la siembra se hace con aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado-son aun más preferidas. Los frascos de siembra se rotan durante la adherencia y el cultivo. La velocidad de rotación se establece entre 0,65 a 0,9 rpm. Preferiblemente, la rotación es entre 0,75 y 1 rpm. Más preferiblemente, los frascos

se rotan a 0,8 a 1 rpm. La rotación cerca de 0 de aproximadamente 1 rpm se prefiere como puede observarse en la Figura 1.

Los frascos rotatorios llenados y sembrados se rotan y se incuban durante 5,5 a 6,5 días para conseguir duplicaciones máximas. Como refleja la Figura 1, también se prefiere la incubación durante 6,2 a 6,3 días.

- 5 También puede observarse a partir de la Figura 1 que la variable independiente puede seleccionarse como un conjunto de parámetros para maximizar la cantidad de duplicaciones de la población. Un sistema de cultivo de frasco rotatorio que comprende un volumen de llenado de aproximadamente 112 ml de medio de crecimiento, y una densidad de siembra de aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado, que se rota a una velocidad de aproximadamente 1 rpm durante una incubación de aproximadamente 6,2 días proporcionará las duplicaciones de población máximas que se pueden conseguir en dicho sistema.

10 Puede observarse que los frascos rotatorios preferidos para su uso están típicamente recubiertos con un agente que ayuda a la adherencia de las células a la superficie interior de los frascos rotatorios, tales como gelatina, moléculas de matriz extracelular (tales como gelatina, laminina, vitronectina, fibronectina, colágeno tipos I, IV, y VI), o similares. Aunque para muchas de las realizaciones ejemplificadas, se usó un recubrimiento de gelatina, se consideran 15 adecuados otros recubrimientos y los especialistas en la técnica apreciarán que los frascos recubiertos disponibles en el mercado son completamente compatibles con los procedimientos mostrados en este documento. Un ejemplo de dichos frascos recubiertos disponibles en el mercado son aquellos recubiertos con CellBIND® (disponible en Corning® con el número de catálogo 3907). El uso de frascos CellBIND® y una comparación con frascos recubiertos con gelatina se ejemplifica en el siguiente Ejemplo 4. Se prevé que se hallarán aceptables diversos agentes de 20 recubrimiento para la adherencia y el cultivo de las células de acuerdo con los procedimientos proporcionados en este documento.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona procedimientos para minimizar la cantidad de horas/duplicaciones de las poblaciones (véase la Figura 2), o expresado de forma alternativa, para maximizar la tasa de duplicación de la población para una población de células cultivadas en un sistema de cultivo de frasco rotatorio. Como se usa en este 25 documento, la tasa de duplicación de la población es la cantidad de duplicaciones de la población por unidad de tiempo, y es recíproca a las horas por duplicación de la población. Conseguir una tasa de duplicación máxima de la población reduce la cantidad de tiempo necesario para producir una cantidad necesaria de células para aplicaciones terapéuticas y aumenta el rendimiento total de un sistema de cultivo de capacidad limitada. Como anteriormente y durante toda esta divulgación, preferiblemente las células son células derivadas postparto, e incluso más 30 preferiblemente las células son células derivadas de cordón umbilical. En una realización actualmente preferida, las células son el número de acceso a la ATCC PTA-6067 o PTA-6068.

Las variables independientes que se han usado para maximizar la cantidad de duplicaciones de la población que se puede conseguir en un cultivo en frasco rotatorio son las mismas que para conseguir la cantidad máxima de duplicaciones de la población: velocidad de rotación, densidad de siembra de las células en los frascos, tiempo de 35 incubación, y volumen del medio colocado en el frasco. La respuesta máxima de la variable independiente, aquí la tasa de duplicación de la población, se mide y computa como una función de estos parámetros.

El análisis de regresión, y particularmente RSM, se empleó de nuevo para maximizar la variable dependiente como función de las cuatro variables independientes.

40 Por tanto, en una realización actualmente preferida, los frascos rotatorios se llenan con aproximadamente 100-300 ml de medio de cultivo, preferiblemente se usan aproximadamente 300 ml, como puede observarse a partir de la Figura 2. Los frascos se siembran con aproximadamente 2500 a aproximadamente 10000 células por centímetro cuadrado. En una realización actualmente preferida, se usa el extremo inferior de ese intervalo, por ejemplo, la siembra es con menos de aproximadamente 3000 células por centímetro cuadrado. Las realizaciones en las que la 45 siembra es a aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado son aun más preferidas. Los frascos sembrados se rotan durante la adhesión y el cultivo. La velocidad de rotación se establece a entre aproximadamente 0,5 a 1 rpm, como puede observarse a partir de la Figura 2. Preferiblemente, la rotación es entre aproximadamente 0,75 y 1 rpm. Más preferiblemente, los frascos rotan a aproximadamente 0,8 a 1 rpm. La rotación cercana a 0 de aproximadamente 0,9-1,0 rpm es actualmente preferida, como se muestra en la figura.

50 Para maximizar la tasa de duplicación de la población, los frascos rotatorios llenados y sembrados se rotan y se incuban durante aproximadamente 5 a 7 días, con un tiempo de incubación preferido de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 días. La Figura 2 también muestra que se prefiere una incubación durante aproximadamente 5 días.

Las variables independientes pueden seleccionarse como un conjunto de parámetros para maximizar la tasa de duplicación de la población, en base a los resultados mostrados en la Figura 2. El sistema de cultivo en frasco 55 rotatorio que comprende un volumen de llenado de aproximadamente 300 ml de medio de cultivo, y una densidad de siembra de aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado, que se rota a una velocidad de aproximadamente 0,9 rpm durante una incubación de aproximadamente 5 días proporcionará la tasa de duplicación de población máxima que se puede conseguir en dicho sistema.

En otro de sus varios aspectos, la invención proporciona procedimientos para maximizar la densidad de células de pendientes de anclaje disponibles para recolectar a partir de una población de células cultivadas en un sistema de cultivo de frasco rotatorio. Como anteriormente, preferiblemente las células son células derivadas postparto, e incluso más preferiblemente las células son células derivadas de cordón umbilical. En una realización actualmente preferida, las células son el número de acceso a la ATCC PTA-6067 o PTA-6068.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona procedimientos para maximizar la densidad de la población celular a recolectar para una población de células cultivadas en un sistema de cultivo de frasco rotatorio. La densidad de recolección se expresa como la cantidad de células por centímetro cuadrado (de área de superficie interna en un frasco rotatorio).

Las variables independientes que se han usado para maximizar la densidad de recolección en un cultivo de frasco rotatorio son las mismas que aquellas para maximizar las otras respuestas analizadas en este documento, es decir, la velocidad de rotación, la densidad de siembra de las células en los frascos, el tiempo de incubación, y el volumen de medio colocado en el frasco. La respuesta máxima de la densidad de recolección se mide y computa como una función de estos parámetros.

El análisis de regresión, y particularmente RSM, se empleó aquí como anteriormente para ayudar a maximizar la variable dependiente como una función de las cuatro variables independientes.

La respuesta máxima de la variable dependiente, aquí la densidad de células disponibles para la recolección se calcula como una función de estos parámetros. En una realización actualmente preferida, los frascos rotatorios se llenan con aproximadamente 100-300 ml de medio de cultivo, preferiblemente se usan aproximadamente 300 ml, como puede observarse a partir de la Figura 3. Los frascos se siembran con aproximadamente 2500 a aproximadamente 10000 células por centímetro cuadrado, preferiblemente la densidad de siembra se selecciona del extremo inferior de ese intervalo, tal como un valor inferior de aproximadamente 3000 células por centímetro cuadrado. Aquellas realizaciones en las que la densidad de siembra es a aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado son más preferidas. Los frascos sembrados se rotan durante toda la adherencia y el cultivo a una velocidad de entre aproximadamente 0,5 y 1 rpm, como se muestra en la Figura 3. En realizaciones preferidas, la rotación es entre aproximadamente 0,75 y 1 rpm. Más preferiblemente, los frascos se rotan a aproximadamente 0,8 a 1 rpm. Actualmente se prefiere una rotación cercana a o de aproximadamente 0,9-1,0 rpm, por ejemplo 0,98 rpm, como se muestra en la figura.

Para maximizar la densidad de recolección de las células cultivadas, los frascos rotatorios llenados y sembrados se rotan e incuban durante aproximadamente 5 a 7 días, con un tiempo de incubación de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 días preferido. La Figura 3 muestra que también se prefiere una incubación durante aproximadamente 5,8 a menos de aproximadamente 6 días o durante aproximadamente 6,5 a aproximadamente 6,7 días.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para minimizar simultáneamente la cantidad de horas/duplicación de la población, maximizando al mismo tiempo la cantidad de duplicaciones de la población y la densidad de recolección (en células por centímetro cuadrado) para una población de células cultivadas en un sistema de cultivos de frasco rotatorio. Dicha optimización de las condiciones de cultivo hace que el sistema de cultivo en frasco rotatorio sea más útil para generar la cantidad de células necesarias para una aplicación terapéutica y aumenta el rendimiento total de un sistema de cultivo de capacidad limitada. Como anteriormente, preferiblemente las células son células derivadas postparto, e incluso más preferiblemente las células son células derivadas de cordón umbilical. En una realización actualmente preferida las células son el número de acceso a la ATCC PTA-6067 o PTA-6068.

Las variables independientes que se han ajustado para ayudar a maximizar simultáneamente la cantidad de duplicaciones de la población que se puede conseguir, la tasa de duplicaciones de la población y la densidad de recolección final de las células en un cultivo de frasco rotatorio son las mismas que las detalladas anteriormente para maximizar los aspectos individuales: es decir, velocidad de rotación, densidad de siembra de las células en los frascos, tiempo de incubación, y volumen de medio colocado en el frasco. La respuesta máxima de las variables dependientes se mide y calcula como una función de estos parámetros independientes.

Como anteriormente, se utilizó análisis de regresión, y particularmente RSM para ayudar a maximizar simultáneamente las tres variables dependientes como una función de las cuatro variables independientes.

Por tanto, en realizaciones preferidas, los frascos rotatorios se llenan con aproximadamente 100-300 ml de medio de cultivo, preferiblemente se usan aproximadamente 300 ml, como puede observarse con referencia a la Figura 4. Los frascos se siembran con aproximadamente 2500 a aproximadamente 10000 células por centímetro cuadrado. En una realización actualmente preferida, se usa el extremo inferior de ese intervalo, por ejemplo la siembra es con menos de aproximadamente 3000 células por centímetro cuadrado. La realizaciones en las que la siembra es a aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado son aun más preferidas. Se usa una densidad de siembra incluso inferior en otras realizaciones. Los frascos sembrados se rotan durante la adherencia y cultivo a velocidades entre aproximadamente 0,5 y 1 rpm. Con referencia adicional a la Figura 4, puede observarse que preferiblemente la

rotación es entre aproximadamente 0,6 y 0,9 rpm. Más preferiblemente, los frascos se rotan a aproximadamente 0,65 a 0,93 rpm. También se prefieren sistemas de cultivo en los que la rotación es cercana a o de aproximadamente 0,85-0,9 rpm como puede observarse en la figura.

- 5 Para optimizar adicionalmente el cultivo en frasco rotatorio, los frascos rotatorios llenados y sembrados se rotan e incuban durante aproximadamente 5 a 7 días, con un tiempo de incubación de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 días preferido. La Figura 4 muestra que también se prefiere una incubación durante aproximadamente 6 días, tal como 5,9, 6,0, 6,1 ó 6,2 días.

- 10 En un sistema de cultivo actualmente preferido, las variables independientes pueden seleccionarse como un conjunto de parámetros para maximizar la tasa de duplicación de la población, en base a los resultados mostrados en la Figura 4. Un sistema de cultivo en frasco rotatorio que comprende un volumen de llenado de aproximadamente 300 ml de medio de cultivo, y una densidad de siembra de aproximadamente 2500 células por centímetro cuadrado, que se rota a una velocidad de aproximadamente 0,7 rpm durante una incubación de aproximadamente 6,1 días proporcionará la tasa de duplicación de la población óptima, la cantidad de total de duplicaciones y la densidad de recolección para las células que se puede conseguir en dicho sistema.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona células postparto, preferiblemente células derivadas de cordón umbilical, que se producen por cualquiera de los procedimientos de la invención, por ejemplo los procedimientos maximizados u optimizados. En diversas realizaciones, las células se producen en poblaciones para uso como agentes terapéuticos celulares, o para proporcionar un producto celular o subproductos útiles, tales como factores celulares o proteínas útiles.

- 20 También se proporcionan composiciones terapéuticas celulares que comprenden células cultivadas por los procedimientos proporcionados en este documento.

- En otro aspecto de la invención, las células que se cultivan de acuerdo con los procedimientos proporcionados se caracterizan porque tienen sustancialmente el mismo perfil de marcadores de superficie celular o perfil de expresión génica que las células de partida. Para muchas aplicaciones de terapias basadas en células es importante que las características celulares no cambien cuando se aumenta en escala las condiciones de cultivo para aumentar las cantidades. Por ejemplo, la morfología, los marcadores de superficie celular, y la expresión de los genes distintivos que ayudan a distinguir o denotar la célula terapéutica deben permanecer sustancialmente inalterados sino idénticos. Las células proporcionadas de acuerdo con la invención y los procedimientos mostrados en la misma están sustancialmente inalteradas, o preferiblemente son idénticas en características tales como las mismas células cultivadas en condiciones de laboratorio a escala. Las células derivadas de cordón umbilical preferidas retienen sustancialmente el mismo perfil de marcadores de superficie celular de las células a partir de las cuales se cultivan. Preferiblemente, las células producidas de acuerdo con los procedimientos proporcionados en este documento expresan más de un marcador de superficie para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-ABC. Más preferiblemente, expresan todos estos marcadores. Las células también preferiblemente expresan no más de uno de los marcadores de superficie celular para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DRDPDQ. Más preferiblemente, las células no expresan ninguno de los anteriores. En una realización altamente preferida, las células expresan un perfil de marcadores de superficie celular idéntico con respecto a cada uno de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-ABC, CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DRDPDQ. Además, las células preferidas son positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-ABC, pero negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, y HLA-DRDPDQ. Los especialistas en la técnica apreciarán que hay varios modos para evaluar el perfil de marcadores de superficie celular de una línea celular. Como se usa en este documento, si detectarse una proteína marcadora de superficie celular a través del uso de un anticuerpo marcado de forma fluorescente, se considera que la célula es positiva y si no puede detectarse el marcador de superficie celular mediante un anticuerpo fluorescente, la célula se considera negativa para ese marcador. La Tabla 7 proporciona un resumen de los marcadores de superficie celular preferidos para las células derivadas de cordón umbilical de la invención.

- De un modo similar, las células producidas de acuerdo con los procedimientos de la invención preferiblemente retienen sustancialmente el mismo, o incluso idéntico perfil de expresión génica, particularmente para genes cuya expresión ayuda a caracterizar la célula, o sirven como distintivos indicativos de esa línea celular. Las células derivadas de cordón umbilical de la invención están indicadas para los genes de expresión para reticulón, LDL-R, IL-8, y GAPDH. Las células proporcionadas son sustancialmente similares, o incluso idénticas en diversas realizaciones con respecto a su expresión de estos genes.

- Estos y otros aspectos de la invención se describen adicionalmente con referencia a las figuras y ejemplos proporcionados a continuación. Los especialistas en la técnica apreciarán que los ejemplos se proporcionan para ejemplificar solamente ciertos aspectos de la invención y no para limitar la invención.

Ejemplo 1: Experimentos de optimización para determinar los parámetros de las condiciones de cultivo

Células: las células usadas fueron de la línea celular derivada de cordón umbilical números de acceso a la ATCC PTA-6067 y/o PTA-6068.

Medio: el medio de cultivo usado durante los experimentos de optimización fue medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa, suero bovino fetal al 15%, penicilina-estreptomina al 1%, y 1 ppm de 2-Mercaptoetanol.

Frascos: se usaron frascos de 850 cm² (por ejemplo, Corning® número de catálogo 430851).

- 5 Recubrimiento de gelatina: se añadieron veinte (20) ml de solución de gelatina al 2% a cada frasco de 850 cm². Los frascos se colocaron en el sistema rotatorio durante 20 minutos a 1 rpm. Se eliminó el exceso de solución de gelatina por aspiración y los frascos se lavaron con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 10 Siembra de células: se descongelaron células P13 umbilicales 022803 de células de solución madre congeladas de un vial criogénico y se lavaron para eliminar el dimetil sulfoxido (DMSO). Las células se sembraron en un único frasco rotatorio de 850 cm² precargado con 300 ml de medio y pregasificado durante 1 minuto con aire comprimido que contenía CO₂ al 5%, gas atmosférico al 95%.

Incubación: las células se cultivaron en un entorno ambiental de temperatura controlada a 37°C.

- 15 Recolección: se retiraron los medios de cada frasco rotatorio por aspiración y se lavaron las células adherentes con 50 ml de PBS. Se retiró el PBS por aspiración y se añadieron 10 ml de tripsina-ácido etilendiaminatetracético (EDTA) para ayudar a la liberación de las células de la superficie del frasco rotatorio. Los frascos se devolvieron al sistema rotatorio y se incubaron durante 5 minutos a 0,75 RPM. Después de la incubación, se añadieron 40 ml de medio a cada frasco. El medio con células después se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 300 x g. Después de la centrifugación, se retiró el medio por aspiración y se resuspendió cada sedimento celular en 10 ml de medio. Las células se contaron usando un instrumento Beckman/Coulter Cedex®.

- 20 Modelo estadístico: se usó un modelo de superficie de respuesta Box-Behnken.

El diseño experimental y la optimización se calcularon usando un Minitab 14.0. Los parámetros ensayados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Factores ensayados y el intervalo de los valores ensayados

Factor	Bajo	Elevado
Velocidad de rotación (rpm)	0,5	1
Volumen de medio (ml)	100	300
Densidad de siembra (células/cm ²)	2.500	10.000
Días	5	7

- 25 Diseño experimental: los experimentos proporcionados en la Tabla 1 se configuraron de acuerdo con los procedimientos anteriores.

- 30 **Tabla 2:** diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken para evaluar los factores y las interacciones de los factores que afectan significativa al rendimiento celular calculado por el software estadístico Minitab 14.0. Los niveles más elevados y más bajos de los factores para la velocidad de rotación (bajo 0,5 rpm, elevado 1,0 rpm) volumen de medio (bajo 100 ml, elevado 500 ml), densidad de siembra (bajo 2500 células/cm², elevado 10000 células/cm²) y días en cultivo (bajo 5 días, elevado 7 días) se definen por el usuario y se calcula el punto medio.

Orden de procesamiento	Velocidad de rotación (rpm)	Volumen de medio (ml)	Densidad de siembra (células/cm ²)	Días
1	0,5	200	6.250	5
2	1	200	6.250	7
3	0,75	300	6.250	7
4	1	200	10.000	6
5	0,75	200	6.250	6
6	0,75	200	2.500	5
7	1	300	6.250	6
8	0,5	200	6.250	7
9	0,5	300	6.250	6
10	1	100	6.250	6
11	0,5	200	10.000	6

(continuación)

Orden de procesamiento	Velocidad de rotación (rpm)	Volumen de medio (ml)	Densidad de siembra (células/cm ²)	Días
12	0,75	300	6.250	5
13	0,75	200	10.000	5
14	0,75	200	2.500	7
15	0,5	100	6.250	6
16	1	200	2.500	6
17	0,75	100	2.500	6
18	0,75	300	2.500	6
19	0,5	200	2.500	6
20	1	200	6.250	5
21	0,75	200	6.250	6
22	0,75	100	6.250	7
23	0,75	200	10.000	7
24	0,75	100	10.000	6
25	0,75	200	6.250	6
26	0,75	300	10.000	6
27	0,75	100	6.250	5

Tabla 3: rendimiento celular obtenido a partir de los niveles de factores definidos por el diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken. La densidad de recolección se expresa en células/cm².

Frasco	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicaciones	Tiempo (días)	Horas/ duplicaciones	Densidad de recolección
1	5,31 E+06	9,80E+06	1,84	0,88	5	136	1,15E+04
2	5,31 E+06	1,68E+07	3,16	1,66	7	101	1,98E+04
3	5,31E+06	1,50E+07	2,82	1,5	7	112	1,76E+04
4	8,50E+06	1,86E+07	2,19	1,13	6	127	2,19E+04
5	5,31E+06	2,10E+07	3,95	1,98	6	73	2,47E+04
6	2,13E+06	1,23E+07	5,79	2,53	5	47	1,45E+04
7	5,31E+06	2,17E+07	4,08	2,03	6	71	2,55E+04
8	5,31E+06	1,62E+07	3,04	1,6	7	105	1,90E+04
9	5,31E+06	2,78E+07	5,23	2,39	6	60	3,27E+04
10	5,31E+06	1,96E+07	3,69	1,88	6	76	2,31E+04
11	8,50E+06	2,94E+07	3,46	1,79	6	80	3,46E+04
12	5,31E+06	1,58E+07	2,97	1,57	5	76	1,86E+04
13	8,50E+06	3,03E+07	3,56	1,83	5	65	3,56E+04
14	2,13E+06	1,50E+07	7,06	2,82	7	60	1,76E+04
15	5,31 E+06	1,31 E+07	2,47	1,3	6	111	1,54E+04
16	2,13E+06	1,59E+07	7,48	2,9	6	50	1,87E+04
17	2,13E+06	1,47E+07	6,92	2,79	6	52	1,73E+04
18	2,13E+06	1,84E+07	8,66	3,11	6	46	2,16E+04
19	2,13E+06	1,22E+07	5,74	2,52	6	57	1,44E+04
20	5,31E+06	1,63E+07	3,07	1,62	5	74	1,92E+04
21	5,31E+06	2,21E+07	4,16	2,06	6	70	2,60E+04
22	5,31E+06	1,77E+07	3,33	1,74	7	97	2,08E+04
23	8,50E+06	3,48E+07	4,1	2,04	7	83	4,10E+04
24	8,50E+06	3,55E+07	4,18	2,06	6	70	4,18E+04

(continuación)

Frasco	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicaciones	Tiempo (días)	Horas/ duplicaciones	Densidad de recolección
25	5,31E+06	2,23E+07	4,2	2,07	6	70	2,62E+04
26	8,50E+06	3,40E+07	4	2	6	72	4,00E+04
27	5,31E+06	1,14E+07	2,15	1,1	5	109	1,34E+04

Tabla 4: análisis de regresión de superficie de respuesta: densidad de recolección (células/cm²) frente a velocidad de rotación, volumen de medio, densidad de siembra y días en cultivo.

Coefficientes de regresión estimados para densidad de recolección (unidades codificadas)

Concepto	Coef	Coef SE	T	P
Constante	25647,1	2841	9,028	0,000
Velocidad de rotación (rpm)	43,1	1420	0,030	0,976
Volumen de medio (ml)	2029,4	1420	1,429	0,179
Densidad de siembra (células/cm ²)	9229,4	1420	6,498	0,000
Días	1921,6	1420	1,353	0,201
Velocidad de rotación (rpm)*	-4010,8	2131	-1,882	0,084
Velocidad de rotación (rpm)				
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	9, 8	2131	0,005	0,996
Densidad de siembra (células/cm ²)*	3898,0	2131	1,830	0,092
Densidad de siembra (células/cm ²)*				
Días*Días	-4887,3	2131	-2,294	0,041
Velocidad de rotación (rpm)*	-3705,9	2460	-1,506	0,158
Volumen de medio (ml)				
Velocidad de rotación (rpm)*	-4264, 7	2460	-1,733	0,109
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Velocidad de rotación (rpm) *Días	-1723,5	2460	-0,701	0,497
Volumen de medio (ml)*	-1529,4	2460	-0, 622	0,546
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Volumen de medio (ml)*Días	-2088,2	2460	-0,849	0,413
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	541,2	2460	0,220	0,830
S = 4920	R-cuad = 85,3%	R-cuad (aju) = 68,2%		

Análisis de la varianza para la densidad de recolección

Fuente	DF	Secuencia SS	Ajuste SS	Ajuste MS	F	P
Regresión	14	1691605592	1691605592	120828971	4,99	0,004
Lineal	4	1115938309	1115938309	278984577	11,52	0,000
Cuadrada	4	408129068	408129068	102032267	4,21	0,023
Interacción	6	167538215	167538215	27923036	1,15	0,391
Error residual	12	290519868	290519868	24209989		
Ausencia de ajuste	10	289163467	289163467	28916347	42,64	0,023
Error puro	2	1356401	1356401	678200		
Total	26	1982125460				

Observaciones inusuales para la densidad de recolección

Obs	Orden Est	Densidad de Recolección	Ajuste	Ajuste SE	Residual	Resid est
4	12	21882,350	30542,156	3757,991	-8659,806	-2,73 R

(R indica una observación con un residual estandarizado grande.)

Coefficientes de regresión estimados para la densidad de recolección (unidades no codificadas)

Concepto	Coef
Constante	-3,05951E+05
Velocidad de rotación (rpm)	195874,5033
Volumen de medio (ml)	281,8629
Densidad de siembra (células/cm ²)	2,3578
Días	69013,6992
Velocidad de rotación (rpm)*	-64172,5667
Velocidad de rotación (rpm)	
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	0,0010
Densidad de siembra (células/cm ²)*	0,0003
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Días*Días	-4887,2529
Velocidad de rotación (rpm)*	-148,2353
Volumen de medio (ml)	
Velocidad de rotación (rpm)*	-4, 5490
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Velocidad de rotación (rpm)*Días	-6894, 1100
Volumen de medio (ml)*	-0,0041
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Volumen de medio (ml)*Días	-20, 8824
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	0, 1443

Tabla 5: análisis de regresión de superficie de respuesta: horas/duplicación frente a velocidad de rotación, volumen de medio, densidad de siembra y días en cultivo.

Coefficientes de regresión estimados para horas/duplicación (unidades codificadas)

Concepto	Coef	Coef SE	T	P
Constante	70,740	10,095	7, 008	0,000
Velocidad de rotación (rpm)	-4,098	5,047	-0,812	0,433
Volumen de medio (ml)	-6,351	5,047	-1,258	0,232
Densidad de siembra (células/cm ²)	15,516	5,047	3,074	0,010
Días	4,068	5,047	0, 806	0,436
Velocidad de rotación (rpm)*	14,990	7,571	1,980	0,071
Velocidad de rotación (rpm)				
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	2,919	7,571	0,386	0,707
Densidad de siembra (células/cm ²)*	-14,948	7,571	-1, 974	0,072
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Días*Días	17,023	7,571	2,248	0,044
Velocidad de rotación (rpm)*	11,188	8,742	1,280	0,225
Volumen de medio (ml)				
Velocidad de rotación (rpm)*	13,635	8,742	1,560	0,145
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Velocidad de rotación (rpm)*Días	14,528	8,742	1, 662	0,122
Volumen de medio (ml)*	1,885	8,742	0,216	0,833
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Volumen de medio (ml)*Días	12,015	8,742	1,374	0,194
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	1,222	8,742	0,140	0,891

S = 17,48

R-cuad = 76,4%

R-cuad (aju) = 48,9%

Análisis de la varianza para horas/duplicación

Fuente	DF	Secuencia SS	Ajuste SS	Ajuste MS	F	P
Regresión	14	11898,4	11898,42	849,89	2,78	0,042
Lineal	4	3773,1	3773,06	943,27	3,09	0,058
Cuadrada	4	5439,2	5439,24	1359,81	4,45	0,020
Interacción	6	2686,1	2686,12	447,69	1,46	0,270
Error residual	12	3668,4	3668,38	305,70		
Ausencia de ajuste	10	3663,0	3662,98	366,30	135,71	0,007
Error puro	2	5,4	5,40	2,70		
Total	26	15566,8				

Observaciones inusuales para horas/Duplicación

Obs	Orden Est	Horas/Duplicación	Ajuste	Ajuste SE	Residual	Resid Est
4	12	127,460	95,835	13,354	31,625	2,80 R

(R indica una observación con un residual estandarizado grande.)

Coefficientes de regresión estimados para horas/duplicación (unidades no codificadas)

Concepto	Coef
Constante	1322,8425
Velocidad de rotación (rpm)	-905,2233
Volumen de medio (ml)	-1,2682
Densidad de siembra (células/cm ²)	0,0036
Días	-269,8567
Velocidad de rotación (rpm)*	239,8467
Velocidad de rotación (rpm)	
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	0,0003
Densidad de siembra (células/cm ²)*	-0,0000
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Días*Días	17,0229
Velocidad de rotación (rpm)*	0,4475
Volumen de medio (ml)	
Velocidad de rotación (rpm)*	0,0145
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Velocidad de rotación (rpm)*Días	58,1100
Volumen de medio (ml)*	0,0000
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Volumen de medio (ml)*Días	0,1202
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	0,0003

Tabla 6: análisis de regresión de superficie de respuesta: duplicaciones de la población frente a velocidad de rotación, volumen de medio, densidad de siembra y días en cultivo.

Coeficientes de regresión estimados para las duplicaciones (unidades codificadas)

Concepto	Coef	Coef SE	T	P
Constante	2,03667	0,15586	13,067	0,000
Velocidad de rotación (rpm)	0,06167	0,07793	0,791	0,444
Volumen de medio (ml)	0,14417	0,07793	1,850	0,089
Densidad de siembra (células/cm ²)	-0,48500	0,07793	-6,223	0,000
Días	0,15250	0,07793	1,957	0,074
Velocidad de rotación (rpm)*	-0,25542	0,11690	-2,185	0,049
Velocidad de rotación (rpm)				
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	-0,03417	0,11690	-0,292	0,775
Densidad de siembra (células/cm ²)*	0,47208	0,11690	4,038	0,002
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Días*Días	-0,35667	0,11690	-3,051	0,010
Velocidad de rotación (rpm)*	-0,23500	0,13498	-1,741	0,107
Volumen de medio (ml)				
Velocidad de rotación (rpm)*	-0,26000	0,13498	-1,926	0,078
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Velocidad de rotación (rpm)*Días	-0,17000	0,13498	-1,259	0,232
Volumen de medio (ml)*	-0,09500	0,13498	-0,704	0,495
Densidad de siembra (células/cm ²)				
Volumen de medio (ml)*Días	-0,17750	0,13498	-1,315	0,213
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	-0,02000	0,13498	-0,148	0,885
S = 0,2700	R-cuad = 89,5%	R-cuad (aju) = 77,3%		

Análisis de la varianza para las duplicaciones

Fuente	DF	Secuencia SS	Ajuste SS	Ajuste MS	F	P
Regresión	14	7,45883	7,45883	0,532773	7,31	0,001
Lineal	4	3,39682	3,39682	0,849204	11,65	0,000
Cuadrada	4	3,29139	3,29139	0,822846	11,29	0,000
Interacción	6	0,77063	0,77063	0,128438	1,76	0,190
Error residual	12	0,87456	0,87456	0,072880		
Ausencia de ajuste	10	0,86969	0,86969	0,086969	35,74	0,028
Error puro	2	0,00487	0,00487	0,002433		
Total	26	8,33339				

Observaciones inusuales para las duplicaciones

Obs	Orden Est	Duplicaciones	Ajuste	Ajuste SE	Residual	Resid Est
4	12	1,130	1,570	0,206	-0,440	-2,52 R

(R indica una observación con un residual estandarizado grande.)

Coefficientes de regresión estimados para las duplicaciones (unidades no codificadas)

Concepto	Coef
Constante	-20,9241
Velocidad de rotación (rpm)	14,0700
Volumen de medio (ml)	0,0221
Densidad de siembra (células/cm ²)	-0,0003
Días	5,3308
Velocidad de rotación (rpm)*	-4,0867
Velocidad de rotación (rpm)	
Volumen de medio (ml)*Volumen de medio (ml)	-0,0000
Densidad de siembra (células/cm ²)*	0,0000
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Días*Días	-0,3567
Velocidad de rotación (rpm)*	-0,0094
Volumen de medio (ml)	
Velocidad de rotación (rpm)*	-0,0003
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Velocidad de rotación (rpm)*Días	-0,6800
Volumen de medio (ml)*	-0,0000
Densidad de siembra (células/cm ²)	
Volumen de medio (ml)*Días	-0,0018
Densidad de siembra (células/cm ²)*Días	-0,0000

Ejemplo 2: Validación de las condiciones de cultivo optimizadas.

Células: las células usadas fueron células derivadas de cordón umbilical identificadas como CBAT 050604B P6 (pase 6).

- 5 Medio: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa, suero bovino fetal al 15%, penicilina-estreptomycin, se usó 2-Mercaptoetanol para los experimentos de validación.

Fascos: los fascos usados fueron fascos de cultivo de 850 cm² (por ejemplo, Corning® número de catálogo 430851).

- 10 Recubrimiento de gelatina: se añadieron veinte mililitros de solución de gelatina al 2% a cada frasco de 850 cm². Los fascos se colocaron en el sistema rotatorio durante 20 minutos. La solución de gelatina se eliminó por aspiración y se lavó cada frasco con 20 ml de PBS.

- 15 Siembra de células: se descongelaron 5,0E+06 células derivadas de cordón umbilical P9 (número 050604B) de un único vial criogénico y se lavaron para eliminar el DMSO. Las células (2,12E+06) se sembraron en un único frasco rotatorio de 850 cm² prellenado con 300 ml de medio y pregasificado durante 1 minuto con aire comprimido que contenía CO₂ al 5%, gas atmosférico al 95%.

Incubación: las células se cultivaron en un entorno ambiental de temperatura controlada a 37°C.

Velocidad: 0,7 RPM.

- 20 Pases: en los pases se retiró el medio de cada frasco rotatorio por aspiración y las células adherentes se lavaron con 50 ml de PBS. Se aspiró el PBS y se añadieron 10 ml de tripsina- EDTA. Los fascos se devolvieron al sistema rotatorio y se incubaron durante 5 minutos a 0,75 RPM. Después de la incubación, se añadieron 40 ml de medio a cada frasco. Después se transfirió el medio de cultivo con las células a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 300 x g. Después de la centrifugación, se eliminó el medio por aspiración y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de medio. Las células se contaron usando un instrumento Beckman/Coulter Cedex®. Las células se sembraron en fascos rotatorios gasificados a aproximadamente 2.500 células/cm².

- 25 Rendimiento celular por pase.

Tabla 7: cinética de crecimiento a partir de la línea celular umbilical 050604B expandida del pase seis al pase nueve en condiciones de cultivo en frasco rotatorio optimizadas.

Pase	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/ Duplicación
		2,13E+06	1				
6	2,13E+06	3,10E+07	1,46E+01	3,87E+00	3,87E+00	6,00	37,24
7	2,13E+06	3,55E+07	1,67E+01	4,06E+00	7,93E+00	7,00	41,36
8	2,13E+06	2,54E+07	1,20E+01	3,58E+00	1,15E+01	6,00	40,23
9	2,13E+06	2,56E+07	1,20E+01	3,59E+00	1,51E+01	6,00	40,10

Ejemplo 3: caracterización de células expandidas en condiciones de cultivo optimizadas.

5 Células: las células usadas para experimentos de caracterización fueron células derivadas de cordón umbilical en pase 6 (050604B P6).

Medio de crecimiento: se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa, suero bovino fetal al 15%, penicilina-estreptomycin, 2-Mercaptoetanol como medio de cultivo.

Frascos: frascos de 850 cm² (por ejemplo, Corning® número de catálogo 430851).

10 Recubrimiento de gelatina: se añadieron veinte (20) ml de solución de gelatina al 2% a cada frasco de 850 cm². Los frascos se colocaron en el sistema rotatorio durante 20 minutos. La solución de gelatina se eliminó por aspiración y cada se lavó cada frasco con 20 ml de PBS.

15 Siembra de células: se descongelaron células derivadas de cordón umbilical en pase 9 (5,0E+06 P9) de un único vial criogénico y se lavaron para retirar el DMSO. Las células (2,12E+06) se sembraron en frascos rotatorios de 850 cm² prellenados con 300 ml de medio y pregasificados durante 1 minuto con aire comprimido que contenía CO₂ al 5%, gas atmosférico al 95%.

Incubación: las células se cultivaron en un entorno ambiental de temperatura controlada a 37°C.

Velocidad: 0,7 RPM.

20 Recolección de células: se retiraron los medios de cada frasco rotatorio por aspiración y las células adherentes se lavaron con 50 ml de PBS. El PBS se retiró por aspiración y se añadieron 10 ml de tripsina-ácido etilendiaminatetracético (EDTA) Los frascos se incubaron durante 5 minutos a 0,75 RPM en el sistema rotatorio. Después de incubación, se añadieron 40 ml de medio a los frascos. Después se transfirió el medio con células a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 300 x g. Después de la centrifugación, se retiró el medio por aspiración y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de medio. Las células se contaron usando un instrumento Beckman/Coulter Cedex®.

25 Tinción de anticuerpos para análisis de citometría de flujo: las células se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1x10⁷ por mililitro. Se añade anticuerpo según las especificaciones del fabricante y se incubó con las células en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para retirar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

30 Análisis de citometría de flujo: se realizó análisis por citometría de flujo con un instrumento FACScalibur™ (Becton Dickinson, San José, CA).

Anticuerpos: se usaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555394
CD31	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555446
CD34	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555821
CD44	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555478
CD45RA	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555489
CD73	BD Pharmingen (San Diego, CA)	550257

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
CD90	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555596
CD117	BD Biosciences (San José, CA)	340529
CD141	BD Pharmingen (San Diego, CA)	559781
PDGFr-alfa	BD Pharmingen (San Diego, CA)	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555553
HLA-DR, DP, DQBD	Pharmingen (San Diego, CA)	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma (St. Louis, MO)	P-4685

Aislamiento de ARN total: el ARN se aisló con un Mini Kit RNeasy® de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Mini Kit RNeasy®; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se eluyó con 50 µL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80°C.

- 5 *Transcripción inversa:* el ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 60 minutos y 95°C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C. Los genes llamados "genes firma" (receptor de LDL oxidado, interleuquina-8, renina y reticulón), se investigaron adicionalmente usando PCR a tiempo real.
- 10 *PCR a tiempo real:* se realizó una PCR sobre muestras de ADNc usando productos de expresión génica Assays-on-Demand™: el receptor de LDL oxidado (Hs00234028), renina (Hs00166915), reticulón (Hs00382515) ligando 3 CXC (Hs00171061), GCP-2 (Hs00605742) IL-8 (Hs00174103) y GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) se mezclaron con ADNc y mezcla maestra de PCR Universal TaqMan de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un sistema de detección de secuencia 7000 con el software ABI prism
- 15 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de ciclo térmico fueron inicialmente 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Resultados:

Tabla 8: expresión de proteínas de superficie celular expresadas por células Umb 050604B expandidas con procedimientos de matraz TC estático o con el procedimiento de frasco rotatorio optimizado analizado por citometría de flujo.

Marcador de superficie celular	Matraz TC estático	Frascos rotatorios
CD 10	(+)	(+)
CD 13	(+)	(+)
CD 31	(-)	(-)
CD 34	(-)	(-)
CD 44	(+)	(+)
CD 45	(-)	(-)
CD 73	(+)	(+)
CD 90	(+)	(+)
CD 117	(-)	(-)
CD 141	(-)	(-)
PDGFr-alfa	(+)	(+)
HLA-ABC	(+)	(+)
HLA-DRDPDQ	(-)	(-)

Análisis por PCR a tiempo real de células expandidas en condiciones de cultivo de frasco rotatorio optimizadas.

Tabla 9: comparación de valores CT para genes expresados por células (Umb 050604B) expandidas en plástico estático con los matraces TC cultivados en las condiciones de frasco rotatorio optimizadas.

Línea celular	Valores CT				Valores CT normalizados		
	reticulón	LDL-R	IL-8	GAPDH	reticulón	LDL-R	IL-8
Umb-Cultivo estático	27,79	32	28,7	27,02	0,972	0,844	0,941
Umb-Frascos rotatorios	24,22	27,37	19.91	20,49	0,846	0,749	1,029

Ejemplo 4: validación de condiciones de cultivo optimizadas en frascos rotatorios CellBIND.

5 Células: 050604B P7.

Medio: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con bajo contenido en glucosa, suero bovino fetal al 15%, penicilina-estreptomicina, 2-Mercaptoetanol.

Frascos: frascos Corning® de 850 cm² (número de catálogo 430851), frascos CellBIND® Corning® de 850 cm² (número de catálogo 3907).

10 Recubrimiento de gelatina: se añadieron 20 ml de solución de gelatina al 2% a frascos Corning® de 850 cm² (número de catálogo 430851) y se colocaron en el sistema rotatorio durante 20 minutos. La solución de gelatina se retiró por aspiración y se lavó con 20 ml de PBS. Los frascos CellBIND® Corning® 850 cm² no están recubiertos.

15 Siembra de células: se descongelaron células 5,0E+06 umbilicales 050604B P9 a partir de un único vial criogénico y se lavaron para retirar el DMSO. Se sembraron células 2,12E+06 en un único frasco rotatorio de 850 cm² prellenado con 300 ml de medio y pregasificado durante 1 minuto con aire comprimido que contenía CO₂ al 5%, gas atmosférico al 95%.

Incubación: las células se cultivaron en un entorno ambiental de temperatura controlada a 37°C.

Velocidad: 0,7 RPM.

20 Pases: en los pases se retiró el medio del frasco rotatorio por aspiración y las células adherentes se lavaron con 50 ml de PBS. Se aspiró el PBS y se añadieron 10 ml de tripsina- EDTA. Los frascos se devolvieron al sistema rotatorio y se incubaron durante 5 minutos a 0,75 RPM. Después de la incubación, se añadieron 40 ml de medio a los frascos. Después se transfirió el medio con las células a un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 300 x g. Después de la centrifugación, se retiró el medio por aspiración y se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de medio. Las células se contaron usando un instrumento Beckman/Coulter Cedex®. Las células se sembraron en 25 frascos rotatorios gasificados a 2.500 células/cm².

Resultados:

Tabla 10: rendimiento celular real por pase para células cultivadas en frascos rotatorios recubiertos con gelatina frente a frascos con CellBind.

Umb050604B Frasco rotatorio óptimo-recubrimiento gelatina									
Pase	Sembrado	Rendimiento	Fecha	Expansión	Duplicación	Tiempo (días)	Tiempo (h)	Horas/duplicación	Densidad de recolección
7	2,13E+06	2,13E +06	4-enero	1					
		2,45E +07	10-enero	1,15E+01	3,53E+00	6,00	144,00	40,83	2,88E+04
Umb050604B Frasco rotatorio óptimo-CellBind									
Pase	Sembrado	Rendimiento	Fecha	Expansión	Duplicación	Tiempo (días)	Tiempo (h)	Horas/duplicación	Densidad de recolección
7	2,13E+06	2,13E+0 6	4-enero	1					
		3,17E+07	10-enero	1,49E+01	3,90E+00	6,00	144,00	36,93	3,73E+04

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para maximizar simultáneamente la tasa de duplicación, la densidad de recolección y la cantidad total de duplicaciones de población para células derivadas de cordón umbilical en un sistema de cultivo de frasco rotatorio que comprende usar una velocidad de rotación de 0,65-0,9 rpm, usando al menos 300 ml de medio de cultivo en un frasco de cultivo de 850 cm²; usar una densidad de siembra de menos de 2500 células por centímetro cuadrado; e incubar durante entre 5,5 a 6,5 días;
5 en el que las células que se cultivan se caracterizan porque tienen un perfil de marcador de superficie celular idéntico a las células de partida con respecto a cada uno de: CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, HLA-ABC, CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DRDPDQ, y en el que las células son positivas para la expresión de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-ABC, pero negativas para la expresión de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DRDPDQ.
10
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células derivadas de cordón umbilical son los números de acceso a la ATCC PTA-6067 y PTA-6068.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la velocidad de rotación es 0,7 rpm, y el tiempo de incubación es de 6 a 6,3 días.
15
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la velocidad de rotación es 0,85 rpm, y el tiempo de incubación es de 6 a 6,3 días.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un tiempo de duplicación de la población es de menos de 39 horas, la población alcanza al menos 3 duplicaciones, y la densidad de células en la recolección es de al menos 1,8 E+4 células/cm².
20

FIGURA 1

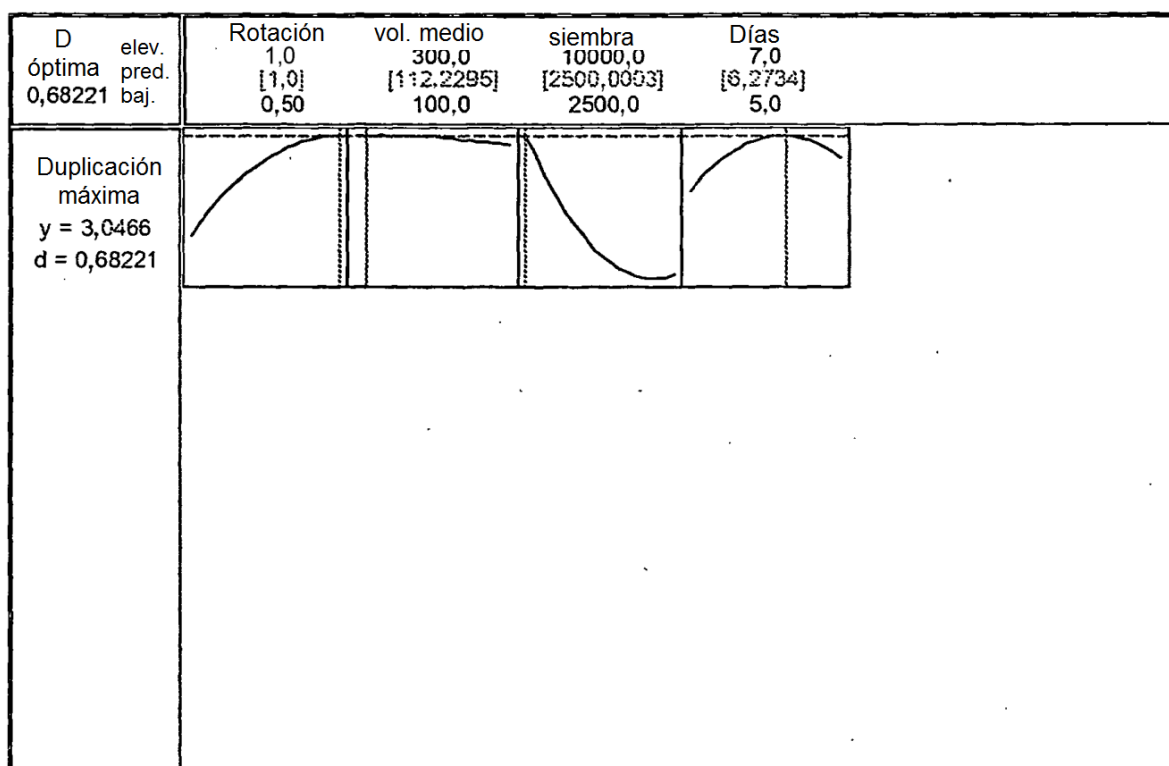


FIGURA 2

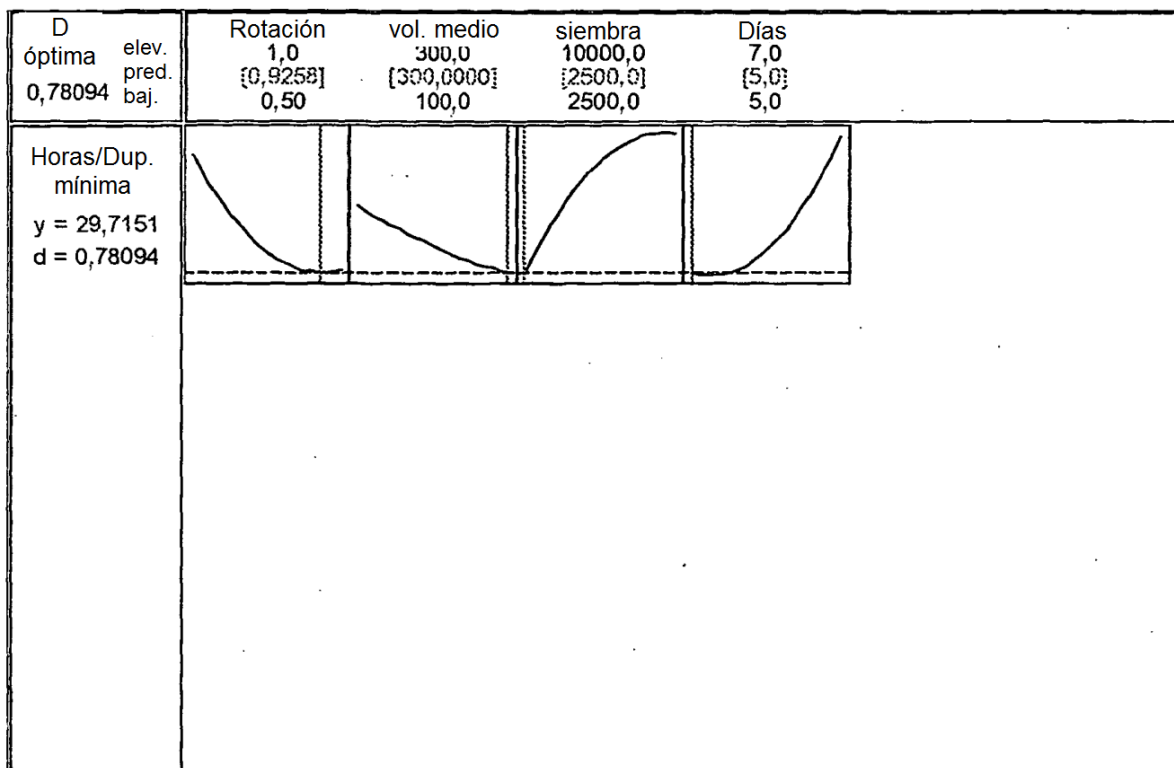


FIGURA 3

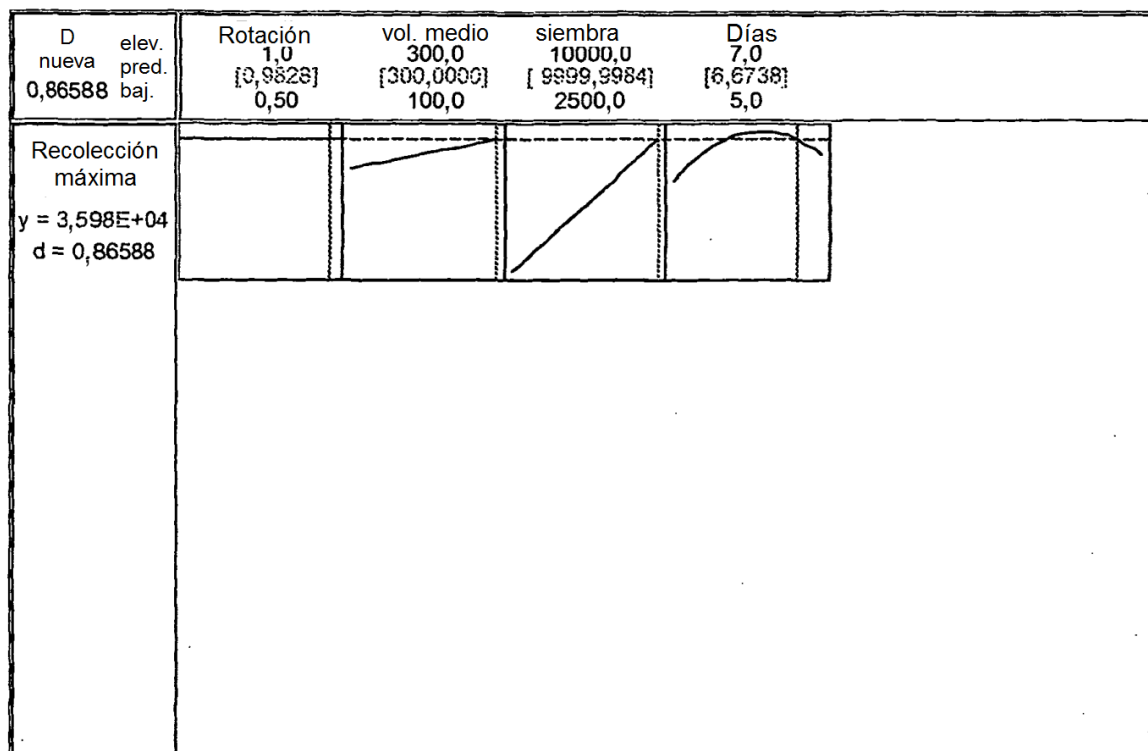


FIGURA 4

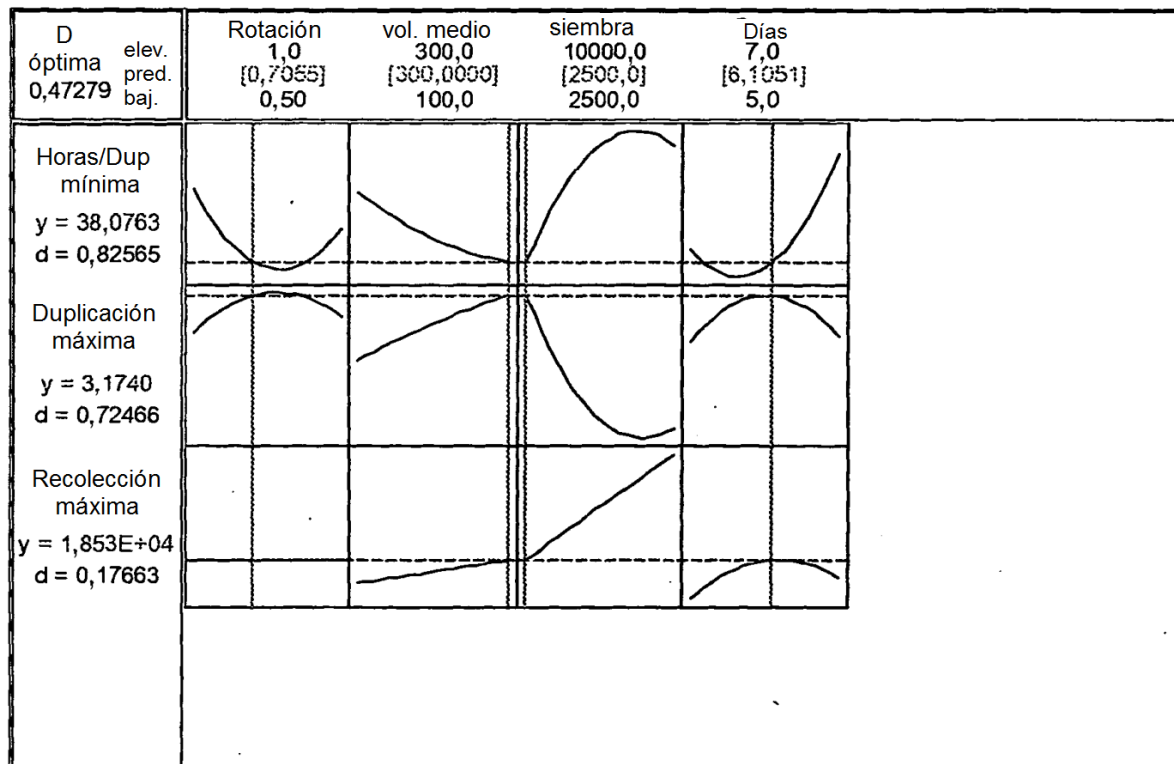


FIGURA 5

