

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 443**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2007 E 07867434 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2089511**

54 Título: **Expansión in vitro de células postparto usando microportadores**

30 Prioridad:

13.11.2006 US 865558 P

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

09.12.2014

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, LLC (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767 , US**

72 Inventor/es:

**HARMON, ALEXANDER M.;
HONG, KLAUDYNE L. S.;
KIHM, ANTHONY J. y
GOSIEWSKA, ANNA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 524 443 T3

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

Expansión *in vitro* de células postparto usando microportadores**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO**

La invención se refiere generalmente al crecimiento y expansión de células de mamífero. En particular, la invención se refiere a procedimientos para el crecimiento y la expansión de células derivadas de tejido umbilical *in vitro* usando superficies o partículas, tales como partículas microportadoras, pellas o perlas.

10

ANTECEDENTES

Los productos de terapia celular comerciales se producen preferentemente en sistemas asépticos que están cerrados. Sin embargo, el crecimiento de muchos tipos de células usadas para producto de terapia celular comercial depende del anclaje.

15

Aunque los reactores de tanque agitado, matraces con agitación, matraces con agitación centrífuga, reactores de sustentación y similares son todos útiles para células que crecen en suspensión (por ejemplo, hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales, muchas células usadas para la tecnología de ADN recombinante y la mayoría de los cultivos de células de insecto), están más limitadas las opciones para cultivar y expandir las células dependientes del anclaje.

20

Incluidas entre las células dependientes del anclaje están muchas cepas de células diploides normales, además de la mayoría de los tipos primarios de células. Las opciones para la producción a gran escala de tales células incluyen botellas rotatorias, lechos de fibra, sistemas de fibra hueca, sistemas de cultivo de múltiples placas o de placas apiladas, CellCube y microportadores, cada uno de los cuales tiene ventajas y desventajas.

25

Los procedimientos de cultivo celular basados en microportadores proporcionan muchas ventajas que incluyen facilidad de procesamiento aguas abajo en muchas aplicaciones. Los microportadores normalmente son de forma aproximadamente esférica, y pueden ser tanto macro- como micro-porosos, o sólidos. El uso de microportadores para la unión de células facilita el uso de reactores de tanque agitado y relacionados para el crecimiento de células dependientes del anclaje. Las células se unen a las micropartículas fácilmente suspendidas. El requisito para la capacidad de suspensión limita los parámetros físicos de los propios microportadores. Así, los microportadores comúnmente tienen un diámetro medio en el intervalo de 50 - 2000 micrómetros. En algunas aplicaciones, los microportadores tipo sólido oscilan de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 micrómetros mientras que las perlas microportadoras tipo poroso oscilan de aproximadamente 250 a aproximadamente 2500 micrómetros. Estos intervalos de tamaño permiten la selección de microportadores que son suficientemente grandes para acomodar muchas células dependientes del anclaje, aunque suficientemente pequeñas para formar suspensiones con propiedades adecuadas para su uso en reactores con agitación.

30

35

40

Tanto los tipos porosos como sólidos de portadores microparticulados están comercialmente disponibles de proveedores. Ejemplos de microportadores comercialmente disponibles incluyen Cytodex 1[®] y Cytodex 3[®], que son ambos microportadores basados en dextrano de GE Healthcare Life Sciences. Los microportadores porosos en el mercado incluyen productos CYTOLINE, además de Cytopore[®], también de GE Healthcare Life Sciences. También están comercialmente disponibles Biosilon[®](NUNC) y Cultispher[®] (PerCELL Biolytica).

45

Aunque para algunos tipos de células la morfología de las células cultivadas sobre superficies altamente curvas, tales como aquellas proporcionadas por microportadores, puede ser un problema, generalmente los microportadores proporcionan muchas ventajas en términos de crecimiento a gran escala, que incluye la facilidad de recogida de las células y la facilidad de separación de productos extracelulares útiles de las propias células. Existe la necesidad en la materia de un procedimiento eficaz y de alto rendimiento para cultivar y recoger células dependientes del anclaje tales como células postparto derivadas de cordón umbilical o placenta.

50

RESUMEN

55

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el crecimiento y la expansión de células de mamífero. Se proporcionan procedimientos para el crecimiento y la expansión de células derivadas de tejido umbilical *in vitro* utilizando superficies tales como perlas microportadoras o perlas microportadoras porosas. Las células de mamífero son células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje.

60

La invención proporciona un procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje que comprende proporcionar al menos una célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje aislable de tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, proporcionar un medio de crecimiento celular para cultivar la célula derivada de tejido umbilical, proporcionar al menos un microportador para la unión de la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el microportador es tanto: (i) un microportador sin proteína que tiene una superficie positivamente cargada; como (ii) un microportador recubierto con colágeno; y poner

65

en contacto la célula dependiente del anclaje con el microportador en presencia del medio de crecimiento en condiciones que permitan la unión y el crecimiento de la célula, en el que las condiciones que permiten la unión y el crecimiento de la célula al inicio del cultivo en microportador usan agitación constante, cultivando así la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el fenotipo de las células es CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFr- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ- y son fenotípicamente las mismas que las células cultivadas en cultivos estáticos para cada uno de los marcadores.

El microportador es un ejemplo de una partícula portadora. El microportador puede comprender materiales naturales o sintéticamente derivados. Ejemplos incluyen microportadores basados en colágeno, microportadores basados en dextrano o microportadores basados en celulosa, además de vidrio, cerámicas, polímeros o metales. El microportador puede estar libre de proteína o recubierto con colágeno. En otro aspecto, el microportador puede comprender, o estar recubierto con, compuestos que potencian la unión de la célula al microportador y potencian la liberación de la célula del microportador que incluyen, pero no se limitan a, poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico), poli-D,L-lactida-co-glicolida, hialuronato de sodio, colágeno, fibronectina, laminina, elastina, lisina, n-isopropilacrilamida, vitronectina. Ejemplos adicionales incluyen microportadores que poseen una microcorriente, tal como microportadores con un par galvánico de partículas de cinc y cobre que producen bajos niveles de electricidad biológicamente relevante; o microportadores que son paramagnéticos, tales como microportadores de calcio-alginato paramagnéticos. En otro aspecto, el procedimiento proporciona una segunda célula tipo co-cultivada con las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje.

El procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje proporciona cultivar las células para producir al menos aproximadamente cinco duplicaciones de la población durante aproximadamente veinte días. El procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje proporciona cultivar las células para producir al menos aproximadamente siete duplicaciones y media de la población durante aproximadamente veinte días.

Se desvelan composiciones que comprenden células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje cultivadas mediante los procedimientos que utilizan partículas portadoras, por ejemplo, partículas microportadoras o partículas microportadoras porosas, para la unión a las células. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje son fenotípicamente las mismas que las células cultivadas en cultivos estáticos como se ha determinado para uno o más de los marcadores CD10, CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, CD141, PDGFr- α , HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. En otro aspecto, las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje son fenotípicamente CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFr- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ-. La invención puede hacer uso de un biorreactor que comprende las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje cultivadas sobre partículas portadoras. Se desvela una composición para terapia celular utilizando las células postparto dependientes del anclaje cultivadas sobre partículas portadoras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Visión general

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el crecimiento y la expansión de células de mamífero. Se proporcionan procedimientos para el crecimiento y la expansión de células derivadas de tejido umbilical de mamífero *in vitro* utilizando superficies tales como perlas microportadoras o perlas microportadoras porosas. Las células de mamífero son células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje de mamífero.

La invención proporciona un procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje que comprende proporcionar al menos una célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje aislable de tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre; proporcionar un medio de crecimiento celular para cultivar la célula derivada de tejido umbilical; proporcionar al menos un microportador para la unión de la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el microportador es tanto: (i) un microportador sin proteína que tiene una superficie positivamente cargada; como (ii) un microportador recubierto con colágeno; y poner en contacto la célula dependiente del anclaje con el microportador en presencia del medio de crecimiento en condiciones que permitan la unión y el crecimiento de la célula, en el que las condiciones que permiten la unión y el crecimiento de la célula al inicio del cultivo en microportador usan agitación constante, cultivando así la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el fenotipo de las células es CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFr- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ- y son fenotípicamente las mismas que las células cultivadas en cultivos estáticos para cada uno de los marcadores.

El microportador es un ejemplo de una partícula portadora. El microportador puede comprender materiales naturales o sintéticamente derivados. Ejemplos incluyen microportadores basados en colágeno, microportadores basados en dextrano o microportadores basados en celulosa, además de vidrio, cerámicas, polímeros (tales como poliestireno), o metales. El microportador puede estar libre de proteína o recubierto con colágeno. En otro aspecto, el

microportador puede comprender, o estar recubierto con, compuestos que potencian la unión de la célula al microportador y potencian la liberación de la célula del microportador que incluyen, pero no se limitan a, poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico), poli-D,L-lactida-co-glicolida, hialuronato de sodio, fibronectina, laminina, elastina, lisina, n-isopropilacrilamida, vitronectina y colágeno. Ejemplos adicionales incluyen

microportadores que poseen una microcorriente, tal como microportadores con un par galvánico de partículas de cinc y cobre que producen bajos niveles de electricidad biológicamente relevante; o microportadores que son paramagnéticos, tales como microportadores de calcio-alginato paramagnéticos. CD13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD 117, CD141, PDGFr- α , HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje son fenotípicamente CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFr- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ-. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje son fenotípicamente CD13+, CD90+, CD34- y CD117-. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje son fenotípicamente CD10+, CD13+, CD44+, CD73+, CD90+ PDGFr- α +, PD-L2+, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, y CD31-, CD34- CD45-, CD80-, CD86-, CD117-, CD141-, CD178-, B7-H2, HLA-G-, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ-.

Debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal y similares, pretende englobar variaciones de ± 20 % o + 10 %, más preferentemente ± 5 %, incluso más preferentemente ± 1 %, y todavía más preferentemente $\pm 0,1$ % del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los procedimientos desvelados.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que se refiere la invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica para probar la presente invención, en el presente documento se describen los materiales y procedimientos preferidos. En la descripción y reivindicación de la presente invención se usará la siguiente terminología.

Las células cultivadas en los procedimientos descritos en el presente documento se denominan "células derivadas del postparto (PPDC)" o "células postparto". Subconjuntos de las células descritas en el presente documento se denominan "células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC)". Además, las células pueden describirse como que son células madre o progenitoras, siendo el último término usado en el sentido amplio. El término "derivadas" se usa para indicar que las células han sido obtenidas de su fuente biológica y cultivadas o manipuladas de otro modo *in vitro* (por ejemplo, cultivadas en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Las manipulaciones *in vitro* de células derivadas de tejido umbilical y las características únicas de las células derivadas de tejido umbilical usadas en la presente invención se describen en detalle más adelante.

Se usan diversos términos para describir células en cultivo. "Cultivo celular" se refiere generalmente a células tomadas de un organismo vivo y cultivadas bajo condiciones controladas ("en cultivo"). Un "cultivo celular primario" es un cultivo de células, tejidos u órganos tomado directamente de organismos y antes del primer subcultivo. Las células se "expanden" en cultivo cuando se ponen en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o división celular, produciendo una mayor población de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide algunas veces por la cantidad de tiempo necesario para que las células se dupliquen en número. Esto se denomina "tiempo de duplicación".

Una "línea celular" es una población de células formada por uno o más subcultivos de un cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivo se denomina un pase. Cuando las células se subcultivan, se denomina que se "han sometido a pases". Una población específica de células, o una línea celular, se denomina o caracteriza algunas por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a diez pases puede denominarse un cultivo "P10". El cultivo primario, es decir, el primer cultivo tras el aislamiento de células del tejido, se designa P0. Tras el primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células son un cultivo terciario (P2 o pase 2), etc. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que puede haber muchos duplicados de poblaciones durante el periodo de pases; por tanto, el número de duplicados de poblaciones de un cultivo es mayor que el número de pase. La expansión de células (es decir, el número de duplicados de poblaciones) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, que incluyen, pero no se limitan a, la densidad de siembra, sustrato, medio, condiciones de crecimiento y tiempo entre pases.

Un "medio acondicionado" es un medio en el que se ha cultivado una célula específica o población de células, y luego se elimina. Mientras que las células se cultivan en el medio, secretan factores celulares que pueden

proporcionar soporte trófico a otras células. Tales factores tróficos incluyen, pero no se limitan a, hormonas, citocinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, vesículas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio acondicionado.

5 Generalmente, un “factor trófico” se define como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o estimula la elevada actividad de una célula. “Soporte trófico” se usa en el presente documento para referirse a la capacidad para promover la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o para estimular la elevada actividad de una célula.

10 Cuando se refiere a células de vertebrado cultivadas, el término senescencia (también “senescencia replicativa” o “senescencia celular”) se refiere a una propiedad atribuible a cultivos celulares finitos; concretamente, su incapacidad para crecer más allá de un número finito de duplicaciones de la población (algunas veces denominado “límite de Hayflick”). Aunque la senescencia celular se describió por primera vez usando células similares a fibroblastos, la mayoría de los tipos de células humanas normales que pueden cultivarse satisfactoriamente en cultivo experimentan senescencia celular. La esperanza de vida *in vitro* de diferentes tipos de células varía, pero la máxima esperanza de vida normalmente es inferior a 100 duplicaciones de la población (es decir, el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y así hagan imposible que el cultivo se divida). La senescencia no depende del tiempo cronológico, pero se mide por el número de divisiones celulares, o duplicaciones de la población, que el cultivo ha experimentado. Así, las células hechas quiescentes eliminando factores de crecimiento esenciales pueden todavía reanudar el crecimiento y división cuando los factores de crecimiento se re-introducen, y después llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que las células cultivadas continuamente equivalentes. Similarmente, cuando las células se congelan en nitrógeno líquido después de diversos números de duplicaciones de la población y luego se descongelan y se cultivan, se someten sustancialmente al mismo número de duplicaciones que las células mantenidas sin congelar en cultivo. Las células senescentes no son células muertas o moribundas; son en realidad resistentes a tanto la división celular como a la muerte celular programada (apoptosis), y pueden mantenerse en su estado no divisor indefinidamente. Estas células están mucho más vivas y son metabólicamente activas, pero no se dividen. Todavía no se ha encontrado que el estado no divisor de células senescentes sea reversible por cualquier agente biológico, químico o viral.

30 “Medio de crecimiento” se refiere a un medio de cultivo suficiente para la expansión de células post-parto. El medio de crecimiento contiene preferentemente medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM). Más preferentemente, el medio de crecimiento contiene glucosa. El medio de crecimiento contiene preferentemente DMEM-baja glucosa (DMEM-LG) (Invitrogen, Carlsbad, CA). El medio de crecimiento contiene preferentemente aproximadamente 15 % (v/v) de suero (por ejemplo, suero bovino fetal, suero bovino definido). El medio de crecimiento contiene preferentemente al menos un agente antibiótico y/o agente antimicótico (por ejemplo, penicilina, estreptomina, anfotericina B, gentamicina, mistatina; preferentemente 50 unidades/mililitro de penicilina G sódica y 50 microgramos/mililitro de sulfato de estreptomina). El medio de crecimiento contiene preferentemente 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis MO). Lo más preferentemente, el medio de crecimiento contiene DMEM-baja glucosa, suero, 2-mercaptoetanol y un agente antibiótico.

40 “Condiciones de crecimiento estándar” se refiere a condiciones atmosféricas estándar que comprenden aproximadamente 5 % de CO₂, una temperatura de aproximadamente 35-39 °C, más preferentemente 37 °C, y una humedad relativa de aproximadamente el 100 %.

45 “Aislado” se refiere a una célula, componente celular o una molécula que se ha eliminado de su entorno nativo.

50 “Células dependientes del anclaje” son células, que incluyen células de mamífero, que necesitan unirse a una superficie, por ejemplo, una superficie de matraz de cultivo de tejido o un superficie de partícula microportadora, que van a duplicarse en cultivo de tejido.

55 “Microportadores” se refiere a partículas, perlas o pellas útiles para la unión y crecimiento de células dependientes del anclaje en cultivo. Los microportadores tienen las siguientes propiedades: (a) son suficientemente pequeños para permitir que se usen en cultivos en suspensión (con una tasa de agitación que no produce daño por cizallamiento significativo a los microportadores o las células); (b) son sólidos, o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento poroso sobre la superficie; y (c) sus superficies (superficie exterior e interior en el caso de portadores porosos) pueden estar positiva o negativamente cargadas. En un aspecto, los microportadores tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μm, y tienen una densidad de carga positiva entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. Microportadores útiles incluyen, sin limitación, Cytodex 1[®], Cytodex 2[®] o Cytodex 3[®] (GE Healthcare Life Sciences).

60 En otro aspecto, el microportador es un portador sólido. Portadores sólidos son particularmente adecuados para células de adhesión, por ejemplo, células dependientes del anclaje. La partícula portadora también puede ser un microportador poroso. Ejemplos adicionales incluyen microportadores que poseen una microcorriente, tal como microportadores con un par galvánico de partículas de cinc y cobre que producen bajos niveles de electricidad biológicamente relevante; o microportadores que son paramagnéticos, tales como microportadores de calcio-alginato

paramagnéticos.

“Microportadores porosos” se refiere a partículas útiles para la unión y crecimiento de células dependientes del anclaje en cultivo. Los microportadores porosos tienen las siguientes propiedades: (a) son suficientemente pequeños para permitir que se usen en cultivos en suspensión (con una tasa de agitación que no produce daño por cizallamiento significativo a los microportadores o las células); (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente para permitir que las células migren en los espacios interiores de la partícula y (c) sus superficies (exterior e interior) pueden estar positiva o negativamente cargadas. En una serie de realizaciones, los portadores (a) tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μm ; (b) tienen poros que tienen un diámetro de abertura del poro promedio de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 μm ; y (c) tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas realizaciones, la carga positiva se proporciona por grupos de DEAE (N,N-dietilaminoetil). Microportadores porosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1[®] y Cytopore 2[®] (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway N.J.).

La invención objeto demuestra por primera vez los procedimientos para el aislamiento y cultivo de células del cordón umbilical que pueden expandirse *in vitro* a grandes números sobre partículas microportadoras o partículas microportadoras porosas. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje pueden diferenciarse en un linaje mesodérmico, o ectodérmico o endodérmico.

Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje usadas en la invención tienen la capacidad para diferenciarse en uno cualquiera o más tipos de tejido que incluyen, pero no se limitan a, tejidos mesodérmicos, tales como tejido adiposo maduro, hueso, cartilago, diversos tejidos del corazón (por ejemplo, pericardio, epicardio, epimiocardio, miocardio, pericardio, tejido de válvula), tejido conjuntivo dérmico, tejidos de hemangioma (por ejemplo, corpúsculos, endocardio, epitelio vascular), tejido hematopoyético, tejidos musculares (incluyendo músculos esqueléticos, músculos cardíacos, músculos lisos), tejidos urogenitales (por ejemplo, riñón, pronefros, conductos meta- y mesonéfricos, divertículo metanéfrico, uréteres, pelvis renal, túbulos colectores), epitelio de las estructuras reproductoras femeninas (particularmente las trompas de Falopio, útero y vagina), tejidos glandulares mesodérmicos (por ejemplo, tejidos de la corteza suprarrenal) y tejidos del estroma (por ejemplo, médula ósea). Por supuesto, en vista de que las células derivadas de tejido umbilical puedan tener la posibilidad de desarrollarse en una célula madura, también pueden realizar su potencial fenotípico de desarrollo diferenciándose en una célula precursora apropiada (por ejemplo, un preadipocito, un premiocito, un preosteocito).

Pueden usarse células derivadas de tejido umbilical o células derivadas de ellas en la reparación, regeneración o aumento de tejido para cualquier tejido del cuerpo. Además, las células de la presente invención pueden usarse para soporte trófico.

Aislamiento de células de tejido postparto

Procedimientos de aislamiento y recogida de PPDC se describen en la publicación de EE.UU. en tramitación junto con la presente nº 2005-0054098 y la publicación de EE.UU. nº 2005-0058631. Para recoger cordón umbilical y placenta postparto para el aislamiento y cultivo de células sobre partículas portadoras, se obtienen la placenta y el cordón umbilical inmediatamente después del parto. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, tras la eliminación de la membrana amniótica, la placenta o cordón umbilical (drenado de sangre), o una sección del mismo, puede transportarse desde el sitio del parto hasta el laboratorio en un recipiente estéril tal como un matraz, vaso de precipitados o placa de cultivo, que contiene una disolución salina o medio tal como, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). El cordón umbilical se mantiene preferentemente y se manipula bajo condiciones estériles antes de y durante la recogida del tejido, y adicionalmente puede esterilizarse superficialmente por un breve tratamiento superficial del cordón con, por ejemplo, un 70 por ciento en volumen de etanol en disolución acuosa, seguido de un aclarado con agua destilada estéril o disolución salina isotónica. El cordón umbilical puede guardarse brevemente durante aproximadamente 1 a 24 horas a aproximadamente 3^o a aproximadamente 50 $^{\circ}\text{C}$. Es preferible mantener el tejido a 4^o a 10 $^{\circ}\text{C}$, pero no congelado, antes de la extracción de células. Pueden incluirse antibióticos o antimicóticos en el medio para reducir la contaminación microbiológica. Se recogen células del cordón umbilical y placenta bajo condiciones estériles por cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica. Estos ejemplos incluyen digestión con enzimas tales como dispasa, colagenasa, tripsina, hialuronidasa, o disección o troceado. Pueden usarse células aisladas o trozos de tejido de los que crecen las células para iniciar los cultivos celulares.

El tejido postparto puede aclararse con disolución de anticoagulante tal como heparina. El tejido puede transportarse en disoluciones usadas para el transporte de órganos usados para trasplante tales como la disolución de la Universidad de Wisconsin o disolución perfluoroquímica.

Cultivo de células postparto

Se transfieren células aisladas a recipientes de cultivo de tejido estériles tanto sin recubrir como recubiertos con matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno, gelatina. Para cultivar las células se añade medio de cultivo tal como DMEM (alta o baja glucosa), medio McCoy's 5A, medio basal de Eagle, medio CMRL, medio esencial mínimo de Glasgow, medio Ham's F-12 (F12), medio Dulbecco modificado por Iscove, medio Liebovitz L-15, MCDB

y RPMI 1640, entre otros. El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes que incluyen, por ejemplo, suero bovino fetal (SBF), suero equino (ES), suero humano (HS), factores de crecimiento, por ejemplo, PDGF, FGF, eritropoyetina y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tal como penicilina G, sulfato de estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina, tanto solos como en combinación, entre otros.

Las células en recipientes de cultivo a una densidad para permitir el crecimiento celular se colocan en una estufa de incubación con 0 al 5 por ciento en volumen de CO₂ en aire y 2 al 25 por ciento de O₂ en aire a 25 a 40 °C. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o estar agitado, por ejemplo, usando un biorreactor. Las células pueden cultivarse bajo estrés oxidativo bajo (por ejemplo, con adición de glutatión, vitamina C, catalasa, vitamina E, N-acetilcisteína). "Estrés oxidativo bajo", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de sin daño por radicales libres o daño por radicales libres mínimo a las células cultivadas. También pueden cultivarse células bajo condiciones alternantes, por ejemplo, en un periodo de normoxia seguido de un periodo de hipoxia.

Procedimientos para la selección del medio de cultivo más apropiado, preparación de medios y técnicas de cultivo celular son muy conocidos en la técnica y se describen en una variedad de fuentes, que incluyen Doyle y col., (eds.), 1995, *Cell & Tissue Culture: Laboratory procedures*, John Wiley and Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, *Animal Cell Biorreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Después de cultivar las células aisladas o trozos de tejido durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 12 días, las células postparto presentes en el tejido explantado tenderán a cultivarse fuera del tejido, tanto como resultado de migración de las mismas como de división celular, o ambos. Las células postparto pueden entonces retirarse a un recipiente de cultivo separado que contiene medio fresco del mismo tipo o diferente que el usado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse mitóticamente.

Alternativamente, los diferentes tipos de células presentes en tejido postparto pueden fraccionarse en subpoblaciones de las que pueden aislarse células postparto. Esto puede llevarse a cabo usando técnicas convencionales para la separación de células que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento enzimático para disociar tejido postparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos específicos de células, usando tanto marcadores morfológicos como bioquímicos, destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa), separación basada en la aglutinabilidad de células diferenciales en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja, procedimiento de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferenciales de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación en contracorriente), unidad de separación por gravedad, distribución en contracorriente, electroforesis y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Para una revisión de técnicas de selección clónica y separación celular véase Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Techniques*, 4^a ed., Wiley-Liss, Inc., New York, 2000, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

El medio se cambia según sea necesario aspirando cuidadosamente el medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y reponiendo medio fresco. La incubación continúa como se ha descrito anteriormente hasta que se acumula un número suficiente o densidad de células en la placa, por ejemplo, aproximadamente 70 por ciento de confluencia. Pueden eliminarse las secciones de tejido explantado originales y se tripsinan las células restantes usando técnicas convencionales o usando un raspador de célula. Después de la tripsinación, se recogen las células, se retiran a medio fresco y se incuban como se ha descrito anteriormente. El medio puede cambiarse al menos una vez a las 24 horas después de la tripsina para eliminar cualquier célula flotante. Las células que quedan en el cultivo son células postparto.

Las células postparto pueden caracterizarse usando citometría de flujo, inmunohistoquímica, matrices de genes, PCR, matrices de proteínas u otros procedimientos conocidos en la técnica.

Las células postparto pueden someterse a al menos 10 duplicaciones de la población. Un experto en la materia podría determinar cuándo una célula ha experimentado una duplicación de poblaciones (Freshney, R.I. *Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Techniques*, 4^a ed., Wiley-Liss, New York, 2000).

Aunque puede aislarse una célula postparto, preferentemente está dentro de una población de células. La invención usa una población definida de células derivadas de tejido umbilical. En una realización, la población es heterogénea. En otra realización, la población es homogénea.

Una población de células postparto puede soportar células para cultivar otras células. Por ejemplo, células que pueden ser soportadas por poblaciones de PPDC pueden incluir otros tipos de citoblastos, tales como citoblastos neurales (NSC), citoblastos hematopoyéticos (HPC, particularmente citoblastos CD34+), citoblastos embrionarios (ESC) y mezclas de los mismos. En otras realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, consistiendo esencialmente en PPDC.

Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje cultivadas sobre partículas microportadoras o

micropartículas porosas se han caracterizado fenotípicamente como las mismas que las células cultivadas en cultivos estáticos para uno o más de los marcadores CD10, CD 13, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD117, CD141, PDGFr- α , HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Las células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje se han caracterizado por tener un fenotipo que comprende CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFr- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ-.

Las células postparto pueden usarse para cribar bibliotecas naturales o sintéticas de compuestos o péptidos para moléculas que afectan la diferenciación o rutas de señalización que incluyen cinasas, por ejemplo, Jak, MAP, Jun, p38 Akt, PKC, calmodulina, tirosina cinasa, SMAD, ERK, JNK, MEK, ErbB, FAK y PI3.

Las células postparto pueden caracterizarse adicionalmente usando análisis de chips génicos o matrices de anticuerpos.

15 **Microportadores para cultivo celular**

El cultivo en microportadores es una técnica que hace posible el práctico cultivo de alto rendimiento de células dependientes del anclaje, por ejemplo, células postparto dependientes del anclaje. Se han desarrollado específicamente microportadores para el cultivo de células, tales como células postparto de mamífero, en volúmenes de cultivo que oscilan de algunos mililitros a más de mil litros. El microportador es biológicamente inerte y proporciona un sustrato fuerte, pero no rígido, para cultivos en microportadores agitados. Los microportadores pueden ser transparentes, permitiendo el examen microscópico de las células unidas. Cytodex 3[®] (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway N.J.) consiste en una delgada capa de colágeno desnaturalizado químicamente acoplada a una matriz de dextrano reticulado. La capa de colágeno desnaturalizado sobre Cytodex 3[®] es susceptible a digestión mediante una variedad de proteasas, que incluyen tripsina y colagenasa, y proporciona la capacidad para eliminar células de los microportadores mientras que se mantiene la máxima viabilidad, función e integridad celular.

Pueden usarse microportadores sin proteína para cultivar células postparto. Por ejemplo, perlas microportadoras para su uso en la fabricación y uso en laboratorio o investigación comercializados bajo el nombre comercial HILLEX[®] (SoloHill Engineering, Inc., Ann Arbor, MI) son perlas de poliestireno modificadas con trimetilamonio catiónico unido a la superficie para proporcionar una superficie positivamente cargada al microportador. El diámetro de perla oscila de aproximadamente 90 a aproximadamente 200 micrómetros de diámetro.

Los procedimientos de cultivo celular basados en microportadores proporcionaron muchas ventajas que incluyen facilidad en el procesamiento aguas abajo en muchas aplicaciones. Los microportadores normalmente son de forma aproximadamente esférica y puede ser tanto porosos como sólidos. El uso de microportadores para la unión de células facilita el uso de reactores de tanque agitado y relacionados para el crecimiento de células dependientes del anclaje. Las células se unen a las micropartículas fácilmente suspendidas. El requisito para la capacidad de suspensión limita los parámetros físicos de los microportadores. Así, los microportadores comúnmente tienen un diámetro medio en el intervalo de 50 - 2000 micrómetros. En algunas aplicaciones, microportadores de tipo sólido oscilan de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 micrómetros, mientras que perlas microportadoras de tipo poroso oscilan de aproximadamente 250 a aproximadamente 2500 micrómetros. Estos intervalos de tamaño permiten la selección de microportadores que son suficientemente grandes para acomodar muchas células dependientes del anclaje, aunque suficientemente pequeños para formar suspensiones con propiedades adecuadas para su uso en reactores con agitación.

Entre los factores considerados en usar perlas microportadoras y similares están: eficiencia de unión, inmunogenicidad, biocompatibilidad, capacidad para biodegradar, tiempo para alcanzar la confluencia, los parámetros de crecimiento de células unidas que incluyen la máxima densidad obtenible por unidad de área superficial, técnicas de desprendimiento si se requiere, y la eficiencia del desprendimiento, aumento de escala de las condiciones de cultivo, además de homogeneidad del cultivo bajo condiciones de escala aumentadas, la capacidad para aumentar satisfactoriamente de escala los procedimientos de desprendimiento, y si las perlas se usarán para implantación. Estas consideraciones pueden influirse por las propiedades superficiales de las perlas microportadoras, además de por la porosidad, diámetro, densidad y propiedades de manipulación del microportador.

Por ejemplo, la densidad de las partículas microportadoras o perlas es una consideración. Excesiva densidad puede hacer que las partículas microportadoras o perlas sedimenten fuera de la suspensión, o tiendan a permanecer completamente hacia el fondo del recipiente de cultivo, y así puede producir una mala mezcla del volumen de las células, medio de cultivo y fases gaseosas en el reactor. Por otra parte, una densidad que es demasiado baja puede producir excesiva flotación del microportador. Una densidad de 1,02 a 1,15 g/cm³ es típica de muchas perlas microportadoras.

El pequeño diámetro de las partículas microportadoras y el volumen de partículas que puede añadirse a un reactor permite que los microportadores contribuyan a un área superficial sustancial en amplio exceso con respecto a la encontrada en botellas rotatorias u otros procedimientos de cultivo de células dependientes del anclaje, por ejemplo, sobre placas. Los microportadores porosos proporcionan incluso mayor área superficial por unidad de volumen o

peso. Estos microportadores porosos poseen grandes cavidades que están disponibles para el crecimiento de células dependientes del anclaje. Estas cavidades aumentan el área superficial enormemente, y pueden proteger las células de los efectos mecánicos perjudiciales, tales como tensión de cizallamiento, por ejemplo, de la mezcla o del burbujeo con gas. Procedimientos de maximización del crecimiento de células postparto en botellas rotatorias se describen en la solicitud de EE.UU. n° de serie 60/751.550, presentada el 19 de diciembre de 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

La superficie del microportador puede texturizarse para potenciar la unión y proliferación de células. La textura de la superficie del microportador se logra por técnicas que incluyen, pero no se limitan a, moldeo, colada, lixiviación y decapado. La resolución de las características de la superficie texturizada puede ser a escala nanométrica. La superficie texturizada puede usarse para inducir un alineamiento de células específico sobre la superficie del microportador. La superficie de los poros dentro de los microportadores porosos también puede texturizarse para potenciar la unión y proliferación celular. La textura de la superficie porosa se logra por técnicas tales como, pero no se limitan a, moldeo, colada, lixiviación y decapado.

La superficie del microportador puede recubrirse por plasma para conferir una carga específica a la superficie de los microportadores. Estas cargas pueden potenciar la unión y proliferación celular.

En otras realizaciones, los microportadores están compuestos de, o recubiertos con, polímeros termosensibles tales como poli-N-isopropilacrilamida, o tienen propiedades electromecánicas.

Los microportadores pueden poseer una microcorriente, tal como microportadores con un par galvánico de partículas de cinc y cobre que producen bajos niveles de electricidad biológicamente relevante. Los microportadores pueden ser paramagnéticos, tales como microportadores de calcio-alginato paramagnéticos.

Tipos tanto porosos como sólidos de portadores microparticulados están comercialmente disponibles de proveedores. Ejemplos de microportadores sólidos comercialmente disponibles incluyen Cytodex 1[®] y Cytodex 3[®], que son ambos microportadores basados en dextrano de GE Healthcare Life Sciences. Microportadores porosos en el mercado incluyen productos CYTOLINE, además de Cytopore[®], también de GE Healthcare Life Sciences. También están comercialmente disponibles Biosilon[®](NUNC) y Cultispher[®] (PerCELL Biolytica).

Las partículas portadoras también pueden contener un agente bioactivo. La partícula portadora también puede contener un agente bioactivo que puede regular el crecimiento o función de células o el medio de tejido. Estos factores pueden incluir, pero no se limitan a, factores de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento transformantes, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento epidérmicos y factores de crecimiento similares a la insulina. Pueden usarse factores completos, miméticos o fragmentos activos de los mismos.

Los microportadores pueden inocularse con un segundo tipo de célula y co-cultivarse con las células postparto dependientes del anclaje. En una realización, los dos (o más) tipos de células pueden ser adherentes a un microportador individual en proporciones iguales o desiguales. Los dos o más tipos de células pueden inocularse sobre el microportador en el mismo momento de tiempo o pueden inocularse en momentos diferentes. Los microportadores pueden tratarse de tal manera para adherir preferencialmente tipos de células específicas sobre regiones específicas del microportador. En otra realización, el microportador con tipos de células individuales o múltiples adherentes puede co-cultivarse en un recipiente de cultivo con un segundo tipo de células cultivadas en suspensión.

Los segundos tipos de células pueden incluir, por ejemplo, células epiteliales (por ejemplo, células de la mucosa oral, tubo gastrointestinal, epitelio nasal, epitelio de las vías respiratorias, epitelio vaginal, epitelio corneal), células de la médula ósea, adipocitos, citoblastos, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células endoteliales vasculares (por ejemplo, células endoteliales aórticas, células endoteliales de las arterias coronarias, células endoteliales de las arterias pulmonares, células endoteliales de las arterias ilíacas, células endoteliales microvasculares, células endoteliales de las arterias umbilicales, células endoteliales de las venas umbilicales y progenitores endoteliales (por ejemplo, células CD34+, CD34+/CD117+)), mioblastos, miocitos, hepatocitos, células de músculo liso, células de músculo estriado, células del estroma, y otras células de tejido blando o células progenitoras, condrocitos, osteoblastos, células de los islotes, células nerviosas que incluyen, pero no se limitan a, neuronas, astrocitos, células de Schwann, células de la glía entérica, oligodendrocitos.

También se incluyen células de tejido de cartílago, tejido de menisco, tejido de ligamento, tejido de tendón, tejido de disco intervertebral, tejido periodontal, tejido de piel, tejido vascular, tejido de músculo, tejido de fascia, tejido del periostio, tejido ocular, tejido olfativo, tejido pericárdico, tejido de pulmón, tejido sinovial, tejido nervioso, tejido de riñón, médula ósea, tejido urogenital, tejido intestinal, tejido del hígado, tejido del páncreas, tejido del bazo o tejido adiposo.

Otras realizaciones y usos serán evidentes para un experto en la materia en vista de las presentes divulgaciones.

REALIZACIONES A MODO DE EJEMPLO**EJEMPLO 1****5 Crecimiento y recogida de células postparto derivadas de tejido umbilical sobre microportadores en biorreactores de matraz con agitación con agitador**

10 Era un objetivo de este trabajo establecer procedimientos para sembrar, expandir y recoger células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) sobre microportadores en biorreactores de matraz con agitación con agitador. Las células cultivadas sobre microportadores deben presentar cinética de crecimiento y fenotipo celular similares a las células cultivadas usando procedimientos en matraces T estáticos. Como etapa inicial para determinar si las células cultivadas con estos procedimientos mantienen su fenotipo típico, se realizó un análisis de marcadores de la superficie celular por citometría de flujo y se comparó con los marcadores de la superficie celular expresados por (hUTC) cultivadas en matraces T. Es un objetivo adicional de este trabajo reducir el uso de tripsina-EDTA (un producto derivado de animal) en el procedimiento, reduciendo así el riesgo de transmitir patógenos.

Materiales y procedimientos:

20 *Células.* Se descongelaron células de CBAT lote nº 050604B de pase 8 y se expandieron en un matraz T225 durante un pase.

Microportadores. Se hidrataron perlas microportadoras Cytodex 3[®] (GE Healthcare Life Sciences, cat. nº 17-0485) en PBS durante al menos 3 horas y se esterilizaron en autoclave.

25 *Matraces con agitación.* Matraz con agitación con ensamblaje de agitador superior interno, 100 ml y 250 ml (Bellco, Inc.).

30 *Confluencia.* La confluencia se define como aproximadamente el 90 % de los microportadores observados en un campo de microscopía representativa que tienen más de aproximadamente el 60 % de su área superficial cubierta con células.

Pase. Pase se define como inocular un matraz con agitación que contiene microportadores frescos con una alícuota de microportadores confluentes obtenidos de un cultivo en matraz con agitación separado.

35 *Inoculación y cultivo.* Se recogieron células del matraz T225 por tripsina y se añadieron alícuotas de 4,0E+06 células a 330 mg de perlas microportadoras en matraz con agitador o con agitación por varilla de vidrio de 100 ml que contenía 40 ml de medio. Los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad-frecuencia del inóculo fue 30 rpm durante 2 minutos cada 30 minutos durante 8 horas. A las ocho horas, el volumen del medio aumentó a 100 ml y la velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C.

40 *Pase.* Se cultivaron células del pase 1 (matraz de 100 ml a 250 ml) durante ocho días. Se recogen todos los microportadores del matraz de 100 ml y se deja que se separen del medio por gravedad. Se aspiró el medio y se resuspendieron los microportadores en 10 ml de medio fresco. Después de pipetear para garantizar una distribución uniforme, se extrajeron 5 ml de medio con microportadores y se distribuyeron en un matraz con agitación de 250 ml. También se añadieron aproximadamente 660 mg de microportadores Cytodex 3[®] hidratados frescos y esterilizados en autoclave y medio al matraz. El volumen del medio aumentó a 200 ml y los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C. Se recogieron las células restantes por tripsinización y se contaron usando un instrumento de PCA de Guava[®] (Guava Technologies, Hayward, CA).

45 *Pase.* Se cultivaron células del pase 2 (matraz de 250 ml a 250 ml) durante seis días. Se recogen todos los microportadores del matraz de 250 ml y se deja que se separen del medio por gravedad. Se aspiró el medio y se resuspendieron los microportadores en 25 ml de medio fresco. Después de pipetear para garantizar una distribución uniforme, se extrajeron 5 ml de medio con microportadores y se distribuyeron en un matraz con agitación de 250 ml. También se añadieron aproximadamente 660 mg de microportadores Cytodex 3[®] hidratados frescos y esterilizados en autoclave y medio al matraz. El volumen del medio aumentó a 200 ml y los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C. Se recogieron las células restantes por tripsinización y se contaron usando un instrumento de PCA de Guava[®].

50 *Intercambio de medio.* Se sacaron matraces con agitación del cultivo y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad al fondo del matraz. Se extrajo aproximadamente la mitad del volumen del medio por aspiración y se sustituyó con un volumen igual de medio fresco. Los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto y se devolvieron al cultivo. El intercambio de medio se realizó en el día 1 y el día 4.

65

Tinción de viabilidad. Se extrajo una alícuota de 1 ml del matraz y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se extrajo medio por aspiración y se sustituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes, cat. nº L3224) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se aplicó una alícuota de 20 microlitros a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron de verde, las células muertas se tiñeron de rojo. Se analizaron manualmente campos microscópicos para evaluar la distribución y relación de las células vivas y muertas adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

Recogida de células. Se recogieron microportadores del matraz con agitación, se lavaron tres veces en PBS y se distribuyeron uniformemente entre dos tubos cónicos de 50 ml. Cada tubo se incubó con 25 ml de tripsina durante 10 minutos a 37 °C. Los tubos se enrasaron a 50 ml de volumen con PBS y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se recogió por aspiración el sobrenadante que contenía las células y se transfirió a tubos cónicos de 50 ml precargados con 2,5 ml de SBF (dando una disolución al 5 % de SBF para inactivar la tripsina). Este procedimiento se repitió cuatro veces con cada fracción recogida por separado. Todas las células recogidas se centrifugaron, se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía suero y se contaron las células usando un instrumento de PCA de Guava®.

Cultivo en matraz T estático. Se usa una alícuota de células recogidas del matraz T225 para sembrar dos matraces T225 y se incuba durante cuatro días usando procedimientos establecidos en la publicación de EE.UU. nº 2005-0054098. Las células se recogieron y se analizaron por citometría de flujo.

Citometría de flujo. Se analizaron células recogidas por citometría de flujo usando un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) para determinar el perfil del marcador de la superficie celular. Todos los anticuerpos se compraron de BD Pharmingen (San Diego, CA).

Resultados:

Recogida de células. La Tabla 1 muestra las fracciones recogidas, rendimientos de células y la viabilidad por pase de la línea de células umbilicales 050604B expandidas del pase nueve al pase once sobre microportadores Cytodex 3® en cultivos en matraz con agitación.

Tabla 1:

Pasaje	Fracciones	Células Totales	Viabilidad media (%)
Inoculación	4	2.85 X10 ⁷	99.7 +/- 0.19
1	8	9.34 X10 ⁷	99.2 +/- 2.65
2	4	8.80 X10 ⁷	94.4 +/- 1.92

Cinética celular. La Tabla 2 muestra la cinética de crecimiento de la línea de células umbilicales 050604B expandidas del pase nueve al pase once sobre microportadores Cytodex 3® en cultivos en matraz con agitación. La tabla muestra que las duplicaciones totales fueron 7,48 y las horas promedio por duplicación fueron 69,53 (+/- 17,52) horas.

Tabla 2:

Pasaje	sembrado	Rendimiento	Días	Expansión	Duplicación	Horas/duplicación
		2.00x10 ⁶	0	1		
Inoculación	2.00x10 ⁶	2.85x10 ⁷	8	14.3	3.83	50.09
1	2.85x10 ⁷	9.34x10 ⁷	6	3.28	1.71	84.12
2	2.30x10 ⁷	8.80x10 ⁷	6	3.83	1.94	74.39

Tinción Live/Dead. El análisis de la alícuota del microportador teñida con Live/Dead muestra la mayoría de las superficies del microportador cubiertas con células teñidas de verde (viables) con pocos focos de núcleos teñidos de rojo (muertas). Las células presentan morfología similar a la morfología de las células cultivadas en condiciones estáticas.

Análisis de citometría de flujo. La Tabla 3 muestra los resultados (“+ positivo” o “- negativo”) para marcadores de la superficie celular expresados por células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) recogidas de perlas microportadoras en matraces con agitación frente a hUTC recogidas del cultivo en matraces T estáticos. La tabla muestra que los marcadores expresados por las células producidas por los dos procedimientos fueron coherentes.

Tabla 3: Comparación de la expresión de proteínas de la superficie celular por células 050604B umbilicales expandidas en matraces T estáticos o sobre microportadores Cytodex 3® en sistemas de matraz con agitación y analizadas por citometría de flujo.

Fabricante de superficie celular	Estática T Frascos	Microsoportes Cytodex 3®
CD 10	(+)	(+)
CD 13	(+)	(+)
CD 31	(-)	(-)
CD 34	(-)	(-)
CD 44	(+)	(+)
CD 45	(-)	(-)
CD 73	(+)	(+)
CD 90	(+)	(+)
CD 117	(-)	(-)
CD 141	(-)	(-)
PDGFR- α	(+)	(+)
HLA-A,B,C	(+)	(+)
HLA-DR,DP,DQ	(-)	(-)

Conclusiones:

Se cultivaron células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) sobre microportadores Cytodex 3® en biorreactores de matraz con agitación con agitador. Las células alcanzaron 7,48 duplicaciones de la población durante veinte días y tuvieron un tiempo de duplicación de la población promedio de 69 horas. La viabilidad celular por pase osciló del 94,4 % al 99,7 %. El análisis para la expresión de trece marcadores de la superficie celular sobre hUTC cultivadas sobre microportadores estuvo de acuerdo con la expresión de marcadores de la superficie celular por hUTC cultivadas en matraces T de cultivo celular. Este trabajo proporciona pruebas iniciales que indican que pueden usarse microportadores para sembrar, expandir y recoger hUTC en sistemas de biorreactor.

EJEMPLO 2

Crecimiento de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportadores de MGSA, HA y PLGA en matraces con agitación

Microportadores usados conjuntamente con sistemas asépticamente cerrados pueden producir posiblemente cantidades comerciales de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas. Los sistemas asépticamente cerrados reducen la manipulación del operario requerida para expandir y mantener productos de células comerciales, reduciendo así el error del operario, la contaminación y la monitorización. Los microportadores proporcionan un área superficial sustancialmente mayor para la unión de células en comparación con matraces de cultivo celular, produciendo así mayor rendimiento de células.

Se investigó la capacidad de las hUTC para unirse a microportadores hechos de biomateriales resorbibles sintéticos, que incluye la capacidad para mantener la viabilidad en cultivo en matraz con agitación, y para proliferar tras volver a sembrarse en cultivo estático. Se sembraron hUTC expandidas sobre microportadores compuestos de los materiales poli-(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA), hialuronato de sodio (HA) y poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico) (MGSA). También se usaron microportadores Cytodex 3® comercialmente producidos como control en este ejemplo. El material con células se cultivó en matraces con agitación durante cinco días, se recogió por tripsinización y se volvió a sembrar en cultivos estáticos. Las células que se volvieron a sembrar se expandieron en cultivo estático en el plazo de cuatro días, demostrando retención de su capacidad proliferativa. Este ejemplo demuestra la capacidad de los biomateriales sintéticos que van a usarse como microportadores para cultivo en matraces con agitación.

Materiales y procedimientos

Tabla 4. Microportadores

Microsoporte	Fabricante	Método de proceso	Medida media (Micrones)
PLGA (85/15) IV 0.75	Alkermes (Willington, OH)	SCF	149
PLGA (50/50) IV 0.43	Alkermes (Willington, OH)	SCF	158
MGSA I	Ethicon (Somerville, NJ)	SCF	195
MGSA II	Ethicon (Somerville, NJ)	Disco giratorio	69
MGSA III	Ethicon (Somerville, NJ)	Disco giratorio	104
HA	NovaMatrix (Drammen, Norway)	Par reómetro	2000
Cytodex 3	Amersham Biosciences	NA	175

Preparación de microesferas de PLGA. Se prepararon microesferas de PLGA por el procedimiento de fluido supercrítico (FSC). La unidad de FSC se esterilizó en autoclave o se limpió con 70 % de etanol y se colocó bajo campana de flujo laminar. Se vertió un gramo de PLGA en la cámara de la unidad de FSC bajo condición aséptica. Se cerró la unidad de FSC, se movió a la campana extractora habitual. La unidad se conectó a un tubo de entrada con un filtro de 0,2 micrómetros. La presión y temperatura fueron 300 bar y 35 °C, respectivamente. La velocidad de giro de la pala fue 250 rpm. La reacción se realizó durante 15 minutos. Después de completarse el procedimiento, la unidad de FSC se desconectó de los tubos de entrada y salida de CO₂ y se movió a la campana de flujo laminar y se abrió la cámara. El material producido se transfirió a un molinillo con nitrógeno líquido y se molió.

Preparación de microesferas de MGSA. Se prepararon microesferas de MGSA por el procedimiento de fluido supercrítico (FSC). La unidad de FSC se esterilizó en autoclave o se limpió con 70 % de etanol y se colocó bajo campana de flujo laminar. Se vertieron dos gramos de MGSA en una cámara de la unidad de FSC bajo condición aséptica. Se cerró la unidad de FSC, se movió a la campana extractora habitual. La unidad se conectó a un tubo de entrada con un filtro de 0,2 micrómetros. La presión y temperatura fueron 150 bar y 35 °C, respectivamente. La velocidad de giro de la pala fue 250 rpm. La reacción se realizó durante 20 minutos. Después de completarse el procedimiento, la unidad de FSC se desconectó de los tubos de entrada y salida de CO₂ y se movió a la campana de flujo laminar y se abrió la cámara.

Procesamiento de hialuronato de sodio. Se pesaron cinco gramos de hialuronato de sodio (Novamatrix, Pharm 80) y el polvo seco se dispuso en un cuenco grande de un reómetro mezclador de torsión (Caleva, R.U.). Después de 10 segundos de mezcla en el reómetro de torsión a 50 rpm se añadió manualmente un mililitro de disolución de etanol/agua (50/50 v/v) (usando una jeringa) en la mezcla en polvo. Después de la adición del fluido, la mezcla continuó durante otros 10 segundos a la misma velocidad y se añadió otro mililitro de disolución de etanol/agua. Este patrón continuó hasta que se añadieron 5 mililitros de disolución. La masa húmeda se dispuso en el accesorio de la prensa extrusora de husillo horizontal y se puso una boquilla que contenía orificios de 2,0 mm de diámetro equidistantes en un único patrón circular en el extremo del accesorio de la prensa extrusora. La velocidad del husillo fue 50 rpm y se usó un ariete manual para forzar la granulación en húmedo en el husillo. La formulación se extruyó en hebras discretas que se secaron rápidamente. Las hebras extruidas se cortaron manualmente con una hoja de cuchilla de afeitar de borde recto en pellas de 2 mm de longitud.

Preparación del microportador. Se suspendió aproximadamente 1 gramo de cada microportador de PLGA en 25 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco durante una hora. Se eliminó la PBS por aspiración y se resuspendieron los materiales en 25 ml de medio de crecimiento durante al menos 30 minutos antes de la inoculación.

Se suspendió aproximadamente 1 g de cada microportador de MGSA en 25 ml de 70 % de etanol durante 30 minutos para humedecer el material. El etanol se eliminó por aspiración y el MGSA se aclaró tres veces con PBS y se resuspendió en 25 ml de medio de crecimiento durante al menos 30 minutos antes de la inoculación.

Se esterilizó hialuronato de sodio (260 mg) en 25 ml de 70 % de alcohol durante 2 horas. El etanol se eliminó por aspiración y a continuación se aclaró tres veces con PBS y se resuspendió en 25 ml de medio de crecimiento durante al menos 30 minutos antes de la inoculación.

El día antes de la inoculación, 775 mg de perlas microportadoras Cytodex 3[®] se hidrataron en 40 ml de PBS durante al menos 3 horas y se esterizaron en autoclave. El día de la inoculación, el PBS se eliminó por aspiración y Cytodex 3[®] se resuspendió en medio de crecimiento durante al menos 30 minutos antes de la inoculación.

Tabla 5. Cantidad de microportador usada.

Microportador	Miligramos	No. Células Sembradas
PLGA (85/15) IV 0.75	700	9.00×10^6
PLGA (50/50) IV 0.43	330	4.50×10^6
MGSA I	470	4.50×10^6
MGSA II	330	4.50×10^6
MGSA III	330	5.00×10^6
HA	261	4.50×10^6
Cytodex 3	775	9.00×10^6

Inoculación y cultivo. Los materiales, tipo de célula, medios de crecimiento, matraz con agitación, condiciones de inoculación y de cultivo, intercambio de medios, tinción de viabilidad y procedimientos de recogida de células usados en el Ejemplo 1 se usan en este ejemplo.

Recogida de células. Debido a las grandes cantidades de residuos de biomaterial en el disco de centrifugación de MGSA (<75 μm), muestras de FSC de MGSA, PLGA (50/50) y HA, y la posibilidad de obstrucción del instrumento, las células recogidas no se contaron usando PCA de Guava®. Todas las células recogidas con residuos se volvieron a sembrar en matraces T225. Los rendimientos de recogida de microportadores se calcularon a partir de los rendimientos de recogida que se volvieron a sembrar.

Resultados

Cálculos del rendimiento de microportadores. Los rendimientos del microportador se calculan basándose en el tiempo de duplicación de la población de 39 horas o la duplicación de 2,46 en un periodo de cuatro días (datos históricos de la cinética de crecimiento de hUTC en condiciones estáticas). Se usa la ecuación de duplicaciones = $(\log_{10}(\text{recogidas}) - \log_{10}(\text{sembradas})) / \log_{10}(2)$.

Tabla 5a. Rendimientos de células finales

Microportador	Células totales	Viabilidad (%)
PLGA (85/15) IV 0.75	1.49×10^6	92.3
PLGA (50/50) IV 0.43	3.46×10^6	NA
MGSA I	8.51×10^6	NA
MGSA II	3.31×10^3	NA
MGSA III	2.30×10^6	94.3
HA	1.38×10^5	NA
Cytodex 3	2.10×10^7	99.2

Recogida de células que volvieron a sembrarse. Se volvieron a sembrar células recogidas de todos los materiales (excepto Cytodex 3®) en matraces de cultivo de tejido T225 a aproximadamente 5.000 células por cm^2 . Las células recogidas de todos los materiales proliferaron tras volver a sembrarse

Se sembraron hUTC expandidas sobre materiales de PLGA, HA y MGSA, se cultivaron en matraces con agitación durante cinco días, se recogieron por tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos. Las células que se recogieron de los microportadores sintéticos fueron más del 90 % viables. Las células que se volvieron a sembrar se expandieron en cultivo estático en el plazo de cuatro días, demostrando retención de su capacidad proliferativa. Este ejemplo demuestra la capacidad de los biomateriales sintéticos que van a usarse como microportadores para cultivo en matraces con agitación.

EJEMPLO 3**Crecimiento de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportadores de MGSA y PLGA recubiertos con colágeno en matraces con agitación**

Se investigó la capacidad de hUTC para unirse a materiales hechos de biomateriales resorbibles sintéticos con un recubrimiento de colágeno, que incluye la capacidad para mantener la viabilidad en cultivo en matraz con agitación y para proliferar tras volver a sembrarse en cultivo estático. Se sembraron hUTC expandidas sobre microportadores de poli-(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico) (MGSA) recubiertos con colágeno o no recubiertos. Los microportadores con células se cultivaron en matraces con agitación durante cinco días, se recogieron por tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos.

Materiales y procedimientos**Tabla 6. Microportadores**

Microsoporte	Fabricante	Método de proceso	Medida media (Micrones)
PLGA (50/50) IV 0.43	Alkermes (Willington, OH)	SCF	158
MGSA I	Ethicon (Somerville, NJ)	SCF	195

Preparación de microportadores. Humedecimiento de microportadores - Se suspendieron asépticamente aproximadamente 1 g de cada uno de los microportadores de MGSA y PLGA en 25 ml de 70 % de etanol durante 30 minutos para humedecer los microportadores. El etanol se eliminó por aspiración y a continuación los microportadores se aclararon tres veces con PBS y se resuspendieron en 25 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco.

Recubrimiento con colágeno. Se sedimentaron microportadores humedecidos (PBS) por centrifugación, la PBS se eliminó por aspiración y los microportadores se resuspendieron en una disolución al 2,9 % de colágeno (Vitrogen 1000, Cohesion, Inc. Palo Alto, CA). Los microportadores se incubaron en colágeno durante 30 minutos. El colágeno residual se eliminó por aspiración y las micropartículas recubiertas con colágeno se lavaron tres veces con PBS.

Tabla 7. Cantidades de microportador usadas

Microportador	Miligramos	No. Sembradas Células
PLGA (50/50) sin recubrimiento	260	3.50×10^6
PLGA (50/50) recubierto	260	3.50×10^6
MGSA I sin recubrimiento	330	3.50×10^6
MGSA I recubierto	330	3.50×10^6

Inoculación y cultivo. Los materiales, tipo de célula, medios de crecimiento, matraz con agitación, condiciones de inoculación y de cultivo, intercambio de medio, tinción de viabilidad y procedimientos de recogida de células usados en el Ejemplo 1 se usaron en este ejemplo.

Resultados**Tabla 7a. Recogida de células.**

Microportador	Células totales	Viabilidad (%)
PLGA (50/50) sin recubrimiento	1.20×10^6	98.6
PLGA (50/50) recubierto	1.15×10^6	97.6
MGSA I sin recubrimiento	1.82×10^6	99.0
MGSA I recubierto	2.39×10^6	97.8

Recogida de células que volvieron a sembrarse. Células recogidas de los microportadores de MGSA y PLGA recubiertos y no recubiertos volvieron a sembrarse en T225 a aproximadamente 5.000 células por cm². Cuatro días después de volver a sembrarse, las células recogidas de ambos materiales proliferaron a más del 50 % de confluencia.

Se sembraron células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportador de PLGA y MGSA recubierto con colágeno, se cultivaron en matraces con agitación durante cinco días, se recogieron por tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos. Las células que se recogieron de los microportadores sintéticos fueron más del 90 % viables. Las células que se volvieron a sembrar se expandieron en cultivo estático en el plazo de cuatro días, demostrando retención de su capacidad proliferativa. Este ejemplo demuestra la capacidad de los biomateriales sintéticos que van a usarse como microportadores para el cultivo en matraces con agitación.

EJEMPLO 4

Crecimiento de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportadores de MGSA recubiertos con gelatina en matraces con agitación

Se investigó la capacidad de hUTC para unirse a microportadores hechos de biomateriales resorbibles sintéticos con un recubrimiento de gelatina, que incluye la capacidad para mantener la viabilidad en cultivo en matraz con agitación y para proliferar tras volver a sembrarse en cultivo estático. Se sembraron hUTC expandidas sobre materiales de poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico) (MGSA) recubiertos con gelatina o no recubiertos. También se usaron microportadores Cytodex 3[®] comercialmente producidos como control en este ejemplo. Los microportadores con células se cultivaron en matraces con agitación durante cinco días, se recogieron por tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos.

Materiales y procedimientos

Tabla 8. Microportadores

Microsoporte	Fabricante	Método de proceso	Medida media (Micrones)
MGSA III	Ethicon (Somerville, NJ)	Disco giratorio	104
Cytodex 3	Amersham Biosciences	NA	175

Preparación de microportadores. Véase el Ejemplo 1 para la preparación de microportadores Cytodex 3[®]. Véase el Ejemplo 2 para el humedecimiento y preparación de microportadores de MGSA.

Recubrimiento con gelatina. Se centrifugaron MGSA no recubierta en PBS, se eliminó la PBS por aspiración y se resuspendió en 25 ml de una disolución al 2 % de gelatina. Los microportadores se incubaron en gelatina durante 30 minutos. La disolución de gelatina residual se eliminó por aspiración y los microportadores recubiertos con gelatina se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 25 ml de PBS.

El día antes de la inoculación, 775 mg de perlas microportadoras Cytodex 3[®] se hidrataron en 40 ml de PBS durante al menos 3 horas y se esterilizaron en autoclave. El día de la inoculación, la PBS se eliminó por aspiración y Cytodex 3[®] se resuspendió en medio de crecimiento durante al menos 30 minutos antes de la inoculación.

Tabla 9a. Cantidades de microportador usadas.

Microportador	Miligramos	No. Sembradas Células
MGSA III sin recubrimiento	330	5.00 x 10 ⁶
MGSA III recubierto	330	5.00 x 10 ⁶
Cytodex 3	775	9.00 x 10 ⁶

Inoculación y cultivo. Los microportadores, tipo de célula, medios de crecimiento, matraz con agitación, condiciones de inoculación y de cultivo, intercambio de medio, tinción de viabilidad y procedimientos de recogida de células usados en el Ejemplo 1 se usan en este ejemplo con las siguientes excepciones. La velocidad/frecuencia del inóculo fue 30 rpm durante 2 minutos cada 30 minutos durante 8 horas. A las ocho horas, el volumen del medio aumentó a 100 ml para MGSA y a 250 ml para Cytodex 3[®] y la velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C.

Intercambio de medio. Después de tres días de cultivo los matraces se sacaron de las placas con agitación y se dejó

que los microportadores sedimentaran. Se extrajo aproximadamente la mitad (50 ml y 125 ml) del medio por aspiración y se sustituyó con un volumen igual de medio de crecimiento fresco.

5 Este procedimiento se usó para los materiales de MGSA con las siguientes excepciones; se usaron tubos cónicos de 50 ml y 10 ml de tripsina.

Todas las células recogidas se centrifugaron, se resuspendieron en medio de crecimiento y se contaron las células usando un instrumento de PCA Guava.

10 Resultados

Tabla 9b. Recogida de células.

15	Microportador	Células totales	Viabilidad (%)
	MGSA III sin recubrimiento	9.71×10^5	89.8
	MGSA III recubierto	1.05×10^6	83.3
20	Cytodex 3	4.50×10^7	98.6

20 *Recogida de células que volvieron a sembrarse.* Células recogidas de los materiales de MGSA recubiertos con gelatina y no recubiertos se volvieron a sembrar en matraces T225 a aproximadamente 5.000 células por cm^2 . Cuatro días después de volver a sembrarse las células recogidas, las células proliferaron a más del 50 % de confluencia.

25 Se sembraron células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre materiales de MGSA, con un recubrimiento de proteína de gelatina, se cultivaron en matraces con agitación durante cinco días, se recogieron por tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos. Las células que se recogieron de los microportadores sintéticos fueron más del 80 % viables. Las células que se volvieron a sembrar se expandieron en cultivo estático en el plazo de cuatro días, demostrando retención de su capacidad proliferativa. Este ejemplo demuestra la capacidad de los biomateriales sintéticos recubiertos con gelatina que van a usarse como microportadores para cultivo en matraz con agitación.

35 EJEMPLO 5

Viabilidad de cultivos de hUTC basados en el microportador SoloHill para la producción y recuperación de células

40 Se evaluó el crecimiento de hUTC expandidas sobre microportadores fabricados por SoloHill, Inc. SoloHill Engineering, Inc. (Ann Arbor, MI). Las perlas microportadoras son vendidas por SoloHill en su catálogo, y se denominarán aquí recubiertas de colágeno (catálogo nº C104-1521), HILLEX[®] II (catálogo nº H112-170) y recubiertas con pronectina (ProNectin F, catálogo nº PF104-1521).

45 Para la producción de hUTC en medio que contiene suero, se evaluaron microportadores recubiertos con colágeno, recubiertos con pronectina y HILLEX[®] II no recubiertos para (1) unión de células, (2) diseminación, (3) crecimiento, (4) eficiencia de la disociación de células y (5) separación de células de microportadores. Las condiciones de cultivo fueron casi idénticas a aquellas usadas para cultivar hUTC en matraces T-225 recubiertos con gelatina antes de la siembra de los cultivos en microportador para los experimentos 1 a 5. Se usaron recuentos manuales de células completas y de núcleos de liberación de células para calcular los índices de crecimiento de hUTC: número de células al inicio del cultivo (densidad de siembra (Ni)), recogida de células en un momento de tiempo especificado (Nh), tiempo en cultivo expresado en horas (t), nivel de duplicación de la población (PDL), duplicación de la población por 24 horas (r) y horas por duplicación de la población (PDT).

55 En estos estudios, la unión de células uniforme a HILLEX[®] II y microportadores recubiertos con colágeno se produjo en el plazo de 1 h y 4 h, respectivamente. Se eliminaron microportadores recubiertos con pronectina de este ejemplo debido a resultados de unión no satisfactorios. Similar a hUTC cultivadas en matraces de cultivo de tejido T-225 recubiertos con gelatina, se produjo la diseminación poco después de la unión de células a microportadores HILLEX[®] II y recubiertos con colágeno. Se usó la medición del crecimiento, basado en los valores de Nh y PDT, para comparar cultivos de tejido y cultivos en microportador; se usaron células cultivadas en matraces de cultivo de tejido T-225 para sembrar los experimentos de cultivo en microportador 1 a 5. Para células cultivadas en matraces T, los valores de Nh estuvieron dentro de un intervalo de $3,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ a $6,9 \times 10^4/\text{cm}^2$ y los valores de PDT estuvieron en el intervalo de 26-36. Usando condiciones de cultivo celular casi idénticas para estudios de viabilidad de cultivos en microportador, los intervalos de Nh/PDT fueron básicamente idénticos a los de células cultivadas en matraces T. Parece que los dos valores atípicos se asociaron al momento de tiempo $92 \text{ h} \pm 4$ que indica, quizás, que las células estaban en la fase de muerte estacionaria. La eliminación de células de HILLEX[®] II y microportadores y matraces T recubiertos con colágeno produjo suspensiones robustas de células individuales. Estos resultados preliminares son

prometedores y se requieren para el aumento de escala del cultivo en microportadores de hUTC. La separación de células de microportadores HILLEX® II y recubiertos con colágeno dio tasas de recuperación que oscilan del 72 % al 146 %.

5 **MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS**

Reactivos: Todos los estudios

Matraces de cultivo de tejido - T-225 Corning, lote nº 13005020

2 % de gelatina porcina - Sigma Corp.

10 Medios de cultivo - DMED-baja glucosa, 15 % de SBF, 1 ppm de BME, 1 % de penicilina/estreptomicina

Línea de hUTC: Umb 120304 P6

Matraces con agitación Bellco - volumen de trabajo de 100 a 250, agitador a medida por SoloHill Engineering, Inc. Agitador de pala recta de Bellco.

15 **Tabla 10. Microportadores de SoloHill Engineering**

Microsoporte	Diámetro (micrones)	Area de superficie (cm ² /gm)	# Microsoporte/gm
HILLEX® II	160-180	515	5.7 x 10 ⁵
Colágeno cubierto	124-212	360	4.6 x 10 ⁵
Pronectina cubierta	125-212	360	4.6 x 10 ⁵

20 *Volumen de los matraces con agitación usados para los estudios.* La tasa fue 225 cm²/50 ml y 675 cm²/150 ml como se indica en los estudios 1 a 5.

30 *Abreviaturas.*

Ni = número de células al inicio del cultivo (densidad de siembra)

Nh = recogida de células en un momento de tiempo especificado

t = tiempo en cultivo expresado en horas

35 PDL = nivel de duplicación de la población

r = duplicación de la población por 24 h

PDT = h por duplicación de la población

40 *Procedimiento de tripsinización preliminar en microportador*

45 Se transfirieron los matraces de la estufa de incubación a la campana de seguridad biológica permitiendo que microportadores HILLEX® II® o recubiertos con colágeno sedimentaran por gravedad. Se extrajo el medio de los microportadores sedimentados. Los microportadores cargados de células se aclararon minuciosamente añadiendo DPBS a una tasa de 2x-4x volumen del paquete de perlas al recipiente teniendo cuidado de no empapar los microportadores y desplazar las células. A continuación se lavó el matraz que contenía los microportadores cargados a 40-55 rpm, temperatura ambiente, durante 15 minutos. Se eliminó el DPBS y se repitió la etapa de lavado. Después de eliminar el segundo aclarado de DPBS, se añadió tripsina (0,05 %) a una tasa de 1x-2x volumen del paquete de microportadores. El matraz que contenía microportadores cargados de células se agitó a 40 rpm-55 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se eliminaron de los microportadores usando observación microscópica en una pipeta de 50-100 ml. Los microportadores se movieron suavemente arriba y abajo en la pipeta para desplazar completamente las células. Se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad y el sobrenadante que contenía células se recogió por pipeta.

55 *Etapas de desarrollo del procedimiento para muestrear un cultivo en microportador; toma de muestras para probar y modificar el protocolo de tripsinización*

60 Se transfirió el recipiente de cultivo de la estufa de incubación a la campana de seguridad biológica colocando el recipiente sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm. Con el cultivo en el modo de agitación, se obtuvo una alícuota de 10 ml con una pipeta de 15 ml extendida a través de un brazo lateral del recipiente en el punto medio del cultivo y sin el montaje de agitador. La alícuota se transfirió a un tubo cónico de 15 ml. (Nota: para células/ml, el paquete de perlas es parte del volumen de 105 ml extraído del cultivo). Se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad y se extrajo el medio por pipeta. Los microportadores cargados de células se aclararon dos veces con 5 ml de DPBS. Después de eliminar el segundo aclarado de DPBS, se añadió tripsina (0,05 %) a una tasa de 1x-2x volumen de paquete de microportadores y se dejó sedimentar durante 10 minutos. Los microportadores se pipetearon suavemente y se dispensaron repetidamente creando suspensión de células individuales. Se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad y el sobrenadante que contenía células se

recogió por pipeta, y se contaron las células.

Procedimiento de liberación de núcleos. Una muestra de cultivo en microportador homogéneo de 1 - 10 ml, tomada con el agitador girando a 50-60 rpm, se transfirió a un tubo, a continuación se centrifugó a 200 g durante 5 min antes de desecharse el sobrenadante. (Nota: HILLEX® II no requirió centrifugación). Los microportadores sedimentados se suspendieron en 1 ml de ácido cítrico 0,1 M (disuelto en agua para el efecto hipotónico) que contenía 0,1 % en peso/volumen de cristal violeta. El contenido del tubo se mezcló bien con un vibromixer (1 min) y a continuación se incubó durante 1 h a 37 °C. Se evitó la evaporación del contenido del tubo usando tanto una estufa de incubación humidificada como cerrando el tubo con película de plástico. Después de la incubación, el contenido del tubo se mezcló de nuevo con el vibromixer antes de contarse los núcleos teñidos liberados con un hemocitómetro. Los microportadores en la muestra no interfieren con el recuento. Las muestras pueden almacenarse durante hasta una semana a 4 °C. Este procedimiento de determinación del número de células en el cultivo es más preciso cuando los cultivos se suspenden uniformemente y cuando las condiciones de cultivo han evitado la agregación de los microportadores y las células.

Diseño experimental del estudio 1. El objetivo de este experimento era definir requisitos de cultivo básicos para la unión de células y la distribución uniforme de células entre tres tipos de microportadores SoloHill (HILLEX® II (H), recubiertos con colágeno (C) y recubiertos con pronectina (P)). Se establecieron tres grupos de microportadores con dos matraces con agitación por grupo. Un matraz en cada grupo se inició con agitación constante y el segundo matraz en cada grupo se inició con un ciclo de agitación intermitente (i). Después de 72 horas en cultivo, el contenido de cada matraz de cultivo se preparó para los recuentos de liberación de núcleos de células.

Variables:

- 1) *Microportadores.* HILLEX® II (H), recubiertos con colágeno (C) o recubiertos con pronectina (PF) en cada grupo
- 2) *Condiciones de agitación dentro de cada grupo:* agitación constante a 50-60 rpm; o agitación intermitente 3 min encendido a 50-60 rpm y 30 min apagado durante hasta 24 horas antes de cambiar a agitación constante
- 3) *Agitador.* Agitador a medida para los cultivos en microportadores HILLEX® II, agitador Bellco para los otros dos grupos de microportadores.

Tabla 11. Métrica por 225 cm² de microportador

Microportador	Peso usado (gr)	# Microsoporte (aprox.)
HILLEX® II	0.44	2.5 x 10 ⁵
Colágeno cubierto	0.63	2.9 x 10 ⁵
Pronectina cubierta	0.63	2.9 x 10 ⁵

Condiciones de cultivo constantes al inicio;

- Área superficial total de 225 cm² por 50 ml de medio
- 3,0 x 10⁶ células/225 cm²
- pH 7,4
- 37 °C/ 5 % de CO₂
- CBAT línea de hUTC de serie 120304 Pase 8

RESULTADOS

Observaciones: Cultivos HILLEX® II mostraron distribución de células uniforme y microportadores individuales confluentes con células tanto a agitación constante como en el ciclo de encendido/apagado intermitente. Los cultivos en microportador recubierto con colágeno mostraron distribución de células uniforme y microportadores individuales confluentes con células con agitación constante. El cultivo en el ciclo intermitente de microportadores recubiertos con colágeno durante las primeras 24 horas formó agregados de microportadores, disminuyendo las células que se cultivaron alrededor de los agregados espectacularmente las cifras de células. Los cultivos en microportador recubierto con pronectina no fueron satisfactorios usando estas condiciones de cultivo en ambos grupos.

Tabla 12. Resultados de la unión de células sobre microportadores

	Constante			Intermitente		
	1 hr	4 hrs	24 hrs	1 hr	4 hrs	24 hrs
Unión celular	H	H	H,C	H	H,PF,C	H,PF,C
Propagación celular		H	H,C		H,C	H,C
No Unión	PF	PF	PF	PF		
No Propagación	H,PF,C	PF,C	PF	H,PF,C	PF	PF
Unión parcial	C	C		C		
distribución celular uniforme	H	H	H,C	H	H	H
Agregación microdistribuidores						C
Agragación celular			PF			PF

Tabla 13. Resultados del recuento de núcleos después de 74 h. En Cultivo (i= intermitente)

	cm ²	Ni	Nh	PDL	r	PDT
Colágeno cubierto	225	3.00 x 10 ⁶	1.66 x 10 ⁷	2.47	0.80	30
	1	1.33 x 10 ⁴	7.40 x 10 ⁴			
Colágeno cubierto-i	225	3.00 x 10 ⁶	6.00 x 10 ⁶	1.0	0.32	74
	1	1.33 x 10 ⁴	2.70 x 10 ⁴			
HILLEX [®] II	225	3.00 x 10 ⁶	1.24 x 10 ⁷	2.05	0.66	36
	1	1.33 x 10 ⁴	5.50 x 10 ⁷			
HILLEXW II i	225	3.00 x 10 ⁶	1.26 x 10 ⁷	2.06	0.67	35.8
	1	1.33 x 10 ⁴	5.50 x 10 ⁴			

Como resultado de este estudio se usará la agitación constante para el inicio del cultivo en microportadores recubiertos con colágeno y HILLEX[®] II. No se requiere el ciclo de agitación intermitente para la unión de hUTC y la diseminación en medio que contiene suero.

Diseño experimental del estudio 2. Para determinar efectos de las densidades de siembra sobre los índices de crecimiento de hUTC, se iniciaron dos grupos de microportador con 3 matraces por grupo. Cada uno de los 3 matraces dentro de un grupo contuvieron diferentes densidades de siembra. Se usó la cifra de núcleos de liberación de células como ensayo cuantitativo de un momento de tiempo entre los días 3 y 4 en cultivo.

Tabla 14. Densidad de siembra de hUTC por grupo:

Grupo	cm ²	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
HILLEX [®] II	675	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷
	1	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴
	Células/microdistribuidor	6	12	18
Colágeno cubierto	675	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷
	1	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴
	Células/microdistribuidor	5	10	16

Tabla 15. Métrica por 675 cm² de microportadores:

Microportador	Peso usado (gr)	# Microsoporte (aprox.)
HILLEX [®] II	1.32	7.5 x 10 ⁵
Colágeno cubierto	1.89	8.7 x 10 ⁵

Condiciones de cultivo constantes al inicio:

- CBAT línea de hUTC de serie 120304 Pase 9
- Agitación constante a 55-60 rpm
- Área superficial de 675 cm² (3X 225 cm²) por 150 ml de medio Hayflick
- 37 °C/ 5 % de CO₂
- pH 7,4
- Tiempo en cultivo
- Un conjunto de suspensión de células para la inoculación del cultivo

Resultados de las cifras de núcleos de liberación de células e índices del crecimiento celular después de 88 h en cultivo

Tabla 16a. Recuento nº 1

	HILLEX® II			Colágeno cubierto		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Ni/675 cm ²	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷
Ni/cm ²	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴
Nh/675 cm ²	4.6 x 10 ⁷	6.2 x 10 ⁷	7.6 x 10 ⁷	2.5 x 10 ⁷	4.9 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁷
Nh/cm ²	6.8 x 10 ⁴	9.1 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁴	7.3 x 10 ⁴	6.9 x 10 ⁴
PDL	3.35	2.78	2.5	2.51	2.45	1.79
r	0.91	0.76	0.68	0.68	0.67	0.49
PDT	26	32	35	35	36	49
HILLEX® II						
	HILLEX® II		Colágeno cubierto			
Ni/225 cm ²	3.0 x 10 ⁶		3.0 x 10 ⁶			
Ni/cm ²	1.3 x 10 ⁴		1.3 x 10 ⁴			
Nh/225 cm ²	1.0 x 10 ⁷		8.1 x 10 ⁶			
Nh/cm ²	4.4 x 10 ⁴		3.6 x 10 ⁴			
PDL	1.7		1.5			
r	0.57		0.47			
PDT	42.1		51.1			
% viabilidad	98		97			

Tabla 16b. Recuento nº 2

	HILLEX® II			Colágeno cubierto		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Ni/675 cm ²	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷	4.5 x 10 ⁶	9.0 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷
Ni/cm ²	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴	6.7 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁴
Nh/675 cm ²	3.9 x 10 ⁷	5.6 x 10 ⁷	6.7 x 10 ⁷	1.7 x 10 ⁷	4.0 x 10 ⁷	4.7 x 10 ⁷
Nh/cm ²	5.7 x 10 ⁴	8.3 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁴	6.0 x 10 ⁴	6.9 x 10 ⁴
PDL	3.1	2.64	2.3	1.9	2.19	1.79
r	0.85	0.72	0.63	0.52	0.6	0.49
PDT	28	33	38	46	40	49

Diseño experimental del estudio 3. El fin de este estudio era triple: 1) determinar la tasa de crecimiento de hUTC sobre microportadores HILLEX® II y recubiertos con colágeno en cultivo durante hasta 96 h. En momentos de tiempo designados se prepararon contenidos de los matraces en el ejemplo para cifras de liberación de núcleos de células (CNR). 2) Determinar la eficiencia del procedimiento de tripsinización en eliminar células individuales de los microportadores y separación de células de los microportadores usando un tamiz de 74 micrómetros de malla. Se usaron cifras de células completas para medir los resultados. 3) Se compararon los resultados de las cifras de células completas y las cifras de núcleos liberadas de células. Se prepararon ocho matraces; cuatro en cada grupo (H y C). Tres matraces en cada grupo se ensayaron por CNR en momentos de tiempo designados. Un matraz en cada grupo se tripsinó y la suspensión de células se filtró.

Tabla 17. Variables:

Grupos	cm ²	Peso usado (gr)	# microsoportes (aprox)	Impulsor	Roio de fenol
HILLEX® II	225	0.44	2.5 x 10 ⁵	custom	Ninauno
Colágeno cubierto	225	0.64	2.9 x 10 ⁵	Bellco	Incluido

Conjunto de suspensión de células para sembrar matraces

- Células suspensas en medio Hayflick con rojo de fenol
- Células suspensas en medio Hayflick sin rojo de fenol

Condiciones de cultivo constantes para el inicio

- CBAT línea de hUTC de serie 120304 Pase 10
- Agitación constante a 55-60 rpm
- Área superficial de 225 cm² por 50 ml de medio de Hayflick completo
- 37 °C/ 5 % de CO₂
- pH 7,4
- Momentos de tiempo d2, d3 y d4 (expresados en horas después del inicio)

Tabla 18. Resultados de la curva de crecimiento expresada en las cifras de núcleos de liberación de células

	HILLEX® II			Colágeno cubierto		
	47 hrs	73 hrs	95 hrs	47 hrs	73 hrs	95 hrs
Ni/225 cm ²		3.0 x 10 ⁶				
Ni/cm ²		1.3 x 10 ⁴				
Nh/225 cm ²		1.4 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁷	7.3 x 10 ⁶	1.7 x 10 ⁷	1.5 x 10 ⁷
Nh/cm ²		6.4 x 10 ⁴	9.6 x 10 ⁴	3.3 x 10 ⁴	7.7 x 10 ⁴	6.8 x 10 ⁴
PDL		2.2	2.8	1.3	2.5	2.3
r		0.74	0.72	0.66	0.83	0.59
PDT		32.6	33.6	36.4	29.8	40.7

Nota: Células insuficientes para sembrar un matraz con HILLEX® II. En el grupo de HILLEX® II no se ensayó el primer punto de tiempo (47 h).

Tabla 19. Resultados de la tripsinización del control de células en T-225 cm² a 73 h en cultivo expresada en cifras de células completas

	W/o Rojo de fenol	W/ Rojo de fenol
5 Ni/675 cm ²	3.0 x 10 ⁶	3.0 x 10 ⁶
Ni/cm ²	1.3 x 10 ⁴	1.3 x 10 ⁴
10 Nh/675 cm ²	8.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁷
Nh/cm ²	3.6 x 10 ⁴	4.7 x 10 ⁴
PDL	1.4	1.8
r	0.46	0.59
15 PDT	52.2	40.7

Diseño experimental del estudio 4. Determinar la eficiencia de recuperación de hUTC tras el procedimiento de tripsinización y separación de células completas de hUTC de microportadores HILLEX[®] II y recubiertos con colágeno. Se prepararon cuatro matraces; dos matraces por grupo (H y C). Se ensayó un matraz de cada grupo tripsinado por cifras de células completas; el segundo matraz en cada grupo se ensayó por cifras de liberación de núcleos de células.

Tabla 20. Variables:

Grupos	cm ²	Peso usado (gr)	# microsoportes (aprox)	Impulsor	Rojo de fenol
HILLEX [®] II	675	1.32	7.5 x 10 ⁵	custom	None
Colágeno cubierto	675	1.89	8.7 x 10 ⁵	Bellco	included

Conjunto de suspensión de células para sembrar matraces

- Células suspensas en medio Hayflick con rojo de fenol
- Células suspensas en medio Hayflick sin rojo de fenol

Tiempo en cultivo; cultivos en HILLEX[®] II 96 h, colágeno 72 h

Condiciones de cultivo constantes para el inicio

- CBAT línea de hUTC de serie 120304 Pase 8
- 9,0 x 10⁶ células por 675 cm²
- Agitación constante a 55-60 rpm
- 675 cm² por 150 ml de medio Hayflick
- 37 °C/ 5 % de CO₂
- pH 7,4

Tabla 21. Resultados de cifras de células completas y las cifras de núcleos de liberación de células (NRC) de colágeno a 72 h

	Pre-filtración		Post-filtración (74 micrones)	
	Células enteras	NCR	Células enteras	Recuperación (%)
Ni/675 cm ²	9.0 x 10 ⁶			
Ni/cm ²	1.3 x 10 ⁴			
Nh/675 cm ²	2.5 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁷	88
Nh/cm ²	3.7 x 10 ⁴	3.2 x 10 ⁴	3.2 x 10 ⁴	
PDL	1.47	1.28		
r	0.49	0.43		
PDT	49	56		

Tabla 22. Resultados de cifras de células completas y las cifras de núcleos de liberación de células (NRC) de HILLEX® II a 96 h

	Pre-filtración		Post-filtración (74 micrones)	
	Células enteras	NCR	Células enteras	Recuperación (%)
Ni/675 cm ²	9.0 x 10 ⁶			
Ni/cm ²	1.3 x 10 ⁴			
Nh/675 cm ²	1.3 x 10 ⁷	4.1 x 10 ⁷	1.9 x 10 ⁷	146
Nh/cm ²	1.9 x 10 ⁴	6.0 x 10 ⁴	2.8 x 10 ⁴	
PDL				
r				
PDT				

Notas: a las 96 hrs culturas HILLEX® II CBAT fueron altamente confluentes como indican los recuentos altos de la NRC. Sin embargo, después de tripsinización había mucho material viscoso que indica una población masiva de células muertas como se indica por los recuentos de células enteras bajas. Las células que se escaparon el material viscoso eran células individuales con una viabilidad del 82%.

Diseño experimental del estudio 5. Se evaluará la eficiencia de tripsinización de CBAT y la separación de células completas de microportadores de colágeno y HILLEX® II. Se prepararon ocho matraces de cultivo; cuatro matraces idénticos por grupo (H y C). Se tripsinó un matraz de cada uno de los dos grupos y las células se filtraron a través un filtro de 74 micrómetros de malla; se ensayó el segundo matraz de cada grupo por las cifras de núcleos de liberación de células. Se compararon las cifras de células completas y las cifras de CRN para coherencia. Se evaluaron dos momentos de tiempo. Se sembraron cultivos a la menor densidad de siembra (6,66 x 10³/cm²).

Tabla 23. Variables:

Grupos	cm ²	Peso usado (gr)	# microsoportes (aprox)	Impulsor
HILLEX® II	225	0.44	2.5 x 10 ⁵	custom
Colágeno cubierto	225	0.63	2.9 x 10 ⁵	Bellco

5 Condiciones de cultivo constantes para el inicio

- CBAT línea de hUTC de serie 120304 Pase 9
- Un conjunto de suspensión de células para la inoculación
- Agitación constante a 55-60 rpm
- 225 cm² por 50 ml de medio Hayflick con rojo de fenol
- 37 °C/ 5 % de CO₂
- pH 7,4
- Tiempo en cultivo; 69 y 92 h
- 150 x 10⁴ células por 225 cm²

15 **Tabla 24. Resultados de cifras de células completas y cifras de núcleos de liberación de células (NRC) de colágeno a 69 h**

	Pre-filtración		Post-filtración (74 micrones)	
	Células enteras	NCR	Células enteras	Recuperación (%)
Ni/675 cm ²	1.5 x 10 ⁶			
Ni/cm ²	6.7 x 10 ³			
Nh/675 cm ²	8.9 x 10 ⁶	9.8 x 10 ⁶	7.0 x 10 ⁶	79
Nh/cm ²	4.0 x 10 ⁴	4.3 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁴	
PDL	2.57	2.7		
r	0.89	0.94		
PDT	27	26		

20 **Tabla 25. Resultados de cifras de células completas y cifras de núcleos de liberación de células (NRC) de HILLEX® II a 69 h**

	Pre-filtración		Post-filtración (74 micrones)	
	Células enteras	NCR	Células enteras	Recovery (%)
Ni/675 cm ²	1.5 x 10 ⁶			
Ni/cm ²	6.7 x 10 ³			
Nh/675 cm ²	8.9 x 10 ⁶	8.9 x 10 ⁶	6.4 x 10 ⁶	72
Nh/cm ²	4.0 x 10 ⁴	4.0 x 10 ⁴	2.8 x 10 ⁴	
PDL	2.56	2.57		
r	0.89	0.89		
PDT	27	27		

25 Nota: la suspensión de células de 25 ml después de la filtración de la cultura HILLEX® II se transfirió a un T-225 matraz. Este cultivo representa todas las células del cultivo HILLEX® II en 69 hrs. El día siguiente, las células se debe tripsinizaron y se contaron. Se supuso que las células viables se unirán y se extendió antes de replicar por lo tanto, las células rescatadas en 24 hrs será igual a las células sembradas a partir del cultivo HILLEX® II

Tabla 26. Resultados del cultivo en T-225 a las 24 h sembrado con las hUTC del cultivo de HILLEX® II

	Célula entera
Nh/225 cm ²	1.07 x 10 ⁷
Nh/cm ²	4.75 x 10 ⁴

Tabla 27. Resultados de cifras de células completas y cifras de núcleos de liberación de células A(NRC) a las 92 h

	Colágeno cubierto		HILLEX® II	T-225 control
	Célula entera	NRC	NRC	Célula entera
Ni/225 cm ²	1.5 x 10 ⁶		1.5 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶
Ni/cm ²	6.7 x 10 ³		6.7 x 10 ³	6.7 x 10 ³
Nh/225 cm ²	1.2 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁷
Nh/cm ²	5.2 x 10 ⁴	5.4 x 10 ⁴	6.3 x 10 ⁴	5.2 x 10 ⁴
PDL	3.0	3.0	3.2	3.0
r	0.77	0.78	0.85	0.78
PDT	31.2	30.8	28.2	30.8

En estos estudios, la unión de células uniforme a microportadores HILLEX® II y recubiertos con colágeno se produjo en el plazo de 1 h y 4 h, respectivamente. La pronectina se eliminó del ejemplo debido a resultados de unión no satisfactorios. Similar a hUTC cultivadas en matraces de cultivo de tejido T-225 recubiertos con gelatina, se produjo la diseminación poco después de la unión de células a microportadores HILLEX® II y recubiertos con colágeno. Se usó la medición del crecimiento, basado en los valores de Nh y PDT, para comparar cultivos de tejido y cultivos en microportador; se usaron células cultivadas en matraces de cultivo de tejido T-225 para sembrar los experimentos de cultivo en microportador 1 a 5. Para células cultivadas en matraces T, los valores de Nh estuvieron dentro de un intervalo de 3,5 x 10⁴/cm² a 6,9 x 10⁴/cm² y los valores de PDT estuvieron en el intervalo de 26-36. Usando condiciones de cultivo celular casi idénticas para estudios de viabilidad de cultivos en microportador, los intervalos de Nh/PDT fueron idénticos a los de células cultivadas en matraces T. Parece que los dos valores atípicos se asociaron al momento de tiempo 92 h ± 4 que indica que quizás las células estaban en la fase de muerte estacionaria. La eliminación de células de microportadores HILLEX® II, recubiertos con colágeno y matraces T produjo suspensiones robustas de células individuales. Estos resultados fueron prometedores y requirieron el aumento de escala del cultivo en microportadores de hUTC. La separación de células de microportadores HILLEX® II y recubiertos con colágeno dio tasas de recuperación que oscilan del 72 % al 146 %.

EJEMPLO 6**Crecimiento de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportadores Cytodex 3® en sistemas de biorreactor de Wave**

Microportadores usados conjuntamente con sistemas asépticamente cerrados pueden producir posiblemente cantidades comerciales de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas. Los sistemas asépticamente cerrados reducen la manipulación del operario requerida para expandir y mantener productos de células comerciales, reduciendo así el error del operario, la contaminación y la monitorización. Los microportadores proporcionan un área superficial sustancialmente mayor para la unión de células en comparación con matraces de cultivo celular, produciendo así mayor rendimiento de células.

El trabajo actual proporciona procedimientos iniciales para la expansión de hUTC sobre microportadores en un sistema de biorreactor asépticamente cerrado de Wave Biotech, Inc. (Wave Biotech LLC, Somerset, NJ). Usando los procedimientos de más adelante, se sembraron inicialmente hUTC sobre microportadores Cytodex 3® en un sistema de matraz con agitación de 250 ml y se cultivaron durante cinco días. A continuación se transfirieron los microportadores con células unidas a un sistema de Wave que contenía medio adicional y microportadores sin células y se cultivaron durante siete días. La transferencia o pase de células del matraz con agitación de 250 ml al

sistema de Wave de 1 l se logró sin el uso de tripsina. Esto elimina un producto derivado de animal del procedimiento de expansión de células. Las hUTC alcanzaron 3,02 de duplicación de la población en 12 días en el sistema de Wave. En la recogida, las células estaban uniformemente distribuidas sobre todos los microportadores muestreados.

5

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Línea de hUTC 120304 Pase 9

10 *Medios.* Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa, 15 % de suero bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomina (P/S), beta-mercaptoetanol (BME)

Cultivo en matraz con agitación de 250 ml

15 *Microportadores.* Se hidrataron perlas microportadoras Cytodex 3[®] (GE Healthcare Life Sciences, cat. n^o 17-0485) en PBS durante al menos 3 horas y se esterilizaron en autoclave.

Matraces con agitación. Matraz con agitación con ensamblaje de agitador superior interno, 250 ml (Bellco, Inc.)

20 *Inoculación y cultivo.* Se recogieron células a aproximadamente el 70 % de confluencia del matraz T225 por tripsina y se añadieron alícuotas de $9,0 \times 10^6$ células a 660 mg de perlas microportadoras en matraz con agitación con agitador de 250 ml que contenía 80 ml de medio. Los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad-frecuencia del inóculo fue 30 rpm durante 2 minutos cada 30 minutos durante 8 horas. A las ocho horas, el volumen del medio aumentó a 250 ml y la velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C

25

BIORREACTOR DE WAVE

30 *Transferencia de microportadores y carga del equipo.* Se recogieron microportadores con células unidas del matraz con agitación de 250 ml y se resuspendieron en 50 ml de medio. Esta disolución se añadió a una bolsa de biorreactor de Wave de 2 l (cat. n^o CELLBAG2L/S-NU) que contenía 1 l de medio y 2,4 g de microportadores Cytodex 3[®] sin células hidratados y esterilizados en autoclave. La bolsa de Wave se cargó sobre un sistema 2/10EH de Wave Biotech. La bolsa de Wave se infló por especificaciones del fabricante usando 5 % de CO₂ atmosférico. La almohadilla de calentamiento del sistema se fijó a 37 °C.

35

Fase de inoculación. El sistema 2/10EH se fijó a un ángulo de 2° y una velocidad de balanceo de 6 rpm durante aproximadamente 16 horas (durante la noche).

40 *Fase de expansión.* El sistema 2/10EH se fijó a un ángulo de 5° y una velocidad de balanceo de 10 rpm durante siete días.

40

Tinción de viabilidad. Se transfirieron una alícuota de 1 ml de medio y microportadores a un tubo cónico de 15 ml y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se extrajo el medio por aspiración, se sustituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes, cat. n^o L3224) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se aplicó una alícuota de 20 microlitros de la suspensión de células a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron de verde y las células muertas se tiñeron de rojo. Se analizaron manualmente campos microscópicos para evaluar la distribución de células viables adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

50

55 *Recogida de células.* Se recogieron microportadores de la bolsa de Wave en cuatro tubos cónicos de 250 ml, se lavaron tres veces en PBS y se combinaron en un tubo cónico de 250 ml. Los microportadores se incubaron con 25 ml de tripsina durante 10 minutos a 37 °C con agitación. Los tubos se enrasaron a 200 ml de volumen con PBS y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se recogió por aspiración el sobrenadante que contenía las células y se transfirió a tubos cónicos de 250 ml precargados con 10 ml de SBF (dando una disolución al 5 % de SBF para inactivar la tripsina). Este procedimiento se repitió dos veces con todas las fracciones combinadas. Todas las células recogidas se centrifugaron, se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía suero y se contaron las células usando un instrumento de PCA de Guava[®].

60

65

Tabla 28. Resultados:

Pasaje	sembrado	Rendimiento	Días	Expansión	Duplicación	Horas/duplicación
		9.00x10 ⁶	0	1		
9	9.00x10 ⁶	7.29x10 ⁷	12	8.1	3.02	95.43

La transferencia de células del matraz con agitación de 250 ml al sistema de Wave se logró sin el uso de tripsina. Esto elimina un producto derivado de animal del procedimiento de expansión de células. Las hUTC lograron 3,02 de duplicación de la población en 12 días en el sistema de Wave. En la recogida, las células estaban uniformemente distribuidas sobre todos los microportadores muestreados. Este procedimiento demuestra la capacidad de las células derivadas de tejido umbilical humanas expandidas para sembrarse, expandirse y recogerse de los microportadores cultivados en sistemas de biorreactor de Wave Biotech.

EJEMPLO 7

Crecimiento de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas sobre microportadores Cytodex 3[®] en un sistema de biorreactor de tres litros

Microportadores usados conjuntamente con sistemas asépticamente cerrados pueden producir posiblemente cantidades comerciales de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas. Los sistemas asépticamente cerrados reducen la manipulación del operario requerida para expandir y mantener productos de células comerciales, reduciendo así el error del operario, la contaminación y la monitorización. Los microportadores proporcionan un área superficial sustancialmente mayor para la unión de células en comparación con matraces de cultivo celular, produciendo así mayor rendimiento de células.

El trabajo actual proporciona procedimientos iniciales para la expansión de hUTC sobre microportadores en un sistema de biorreactor asépticamente cerrado de tres litros con agitación con agitador. Las hUTC lograron 2,88 duplicaciones de la población en este sistema. El consumo de glucosa y la producción de lactato en el biorreactor con el tiempo fueron indicativos de células metabólicamente activas. En la recogida, las células presentes parecieron estar uniformemente distribuidas sobre los microportadores muestreados. Las células recogidas del biorreactor tras volver a sembrarse en condiciones estáticas de cultivo se expandieron hasta confluencia, demostrando retención de la capacidad proliferativa de las células. Este procedimiento demuestra la capacidad de células derivadas de tejido umbilical humanas expandidas para sembrarse, expandirse y recogerse de los microportadores cultivados en un sistema de biorreactor asépticamente cerrado de tres litros con agitación con agitador.

Usando estos procedimientos, se sembraron inicialmente hUTC sobre microportadores Cytodex 3[®] en un sistema de matraz con agitación de 250 ml y se cultivaron durante cinco días. A continuación se transfirieron los microportadores con células unidas al sistema de biorreactor que contenía 1 l de medio y microportadores sin células adicionales y se cultivaron durante siete días. En el día siete se añadieron 2 l de medio adicionales y microportadores sin células adicionales al sistema de biorreactor y se cultivaron durante diez días.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Línea de hUTC Umb 120304, pase 9

Medios. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa, 15 % de suero bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomina (P/S), beta-mercaptopetanol (BME)

MATRAZ CON AGITACIÓN DE 250 ml

Microportadores. Se hidrataron perlas microportadoras Cytodex 3[®] (GE Healthcare Life Sciences, cat. n° 17-0485) en PBS durante al menos 3 horas y se esterilizaron en autoclave.

Matraces con agitación. Matraz con agitación con ensamblaje de agitador superior interno, 250 ml (Bellco, Inc.)

Inoculación y cultivo. Se recogieron células a aproximadamente el 70 % de confluencia del matraz T225 por tripsina y se añadieron alícuotas de 9,0E+06 células a 660 mg de perlas microportadoras en matraz con agitación con agitador de 250 ml contenía 80 ml de medio. Los matraces se lavaron con 5 % de gas CO₂ durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad-frecuencia del inóculo fue 30 rpm durante 2 minutos cada 30 minutos durante 8 horas. A las ocho horas, el volumen del medio aumentó a 250 ml y la velocidad del agitador se fijó a 45 rpm de rotación continua y se incubó a 37 °C.

BIORREACTOR

Equipo. Se usó un sistema de biorreactor cerrado de tres litros con agitación con agitador. Los parámetros del sistema (pH, tensión del oxígeno, temp, rpm del agitador) se controlaron con un BioStat B-DCU (B. Braun International).

Recogida previa al biorreactor. Se recogieron microportadores con células unidas del matraz con agitación de 250 ml y se resuspendieron en 30 ml de medio. Se extrajo una alícuota de 5 ml de la suspensión (que contenía aproximadamente 100 mg o 1/6 de los microportadores totales). Las células de esta alícuota se recogieron usando los procedimientos enumerados más adelante.

Transferencia de microportadores - 250 ml a 1 l. Se resuspendieron los 500 mg restantes de microportadores con células unidas recogidas del matraz con agitación de 250 ml en 50 ml de medio. Esta disolución se añadió a una bolsa de biorreactor de Wave de 2 l (cat. nº CELLBAG2L/S-NU) que contenía 1 l de medio y 2,6 g de microportadores Cytodex 3[®] sin células hidratados y esterilizados en autoclave. A continuación se soldó de forma estéril la bolsa de Wave sobre un puerto de entrada al biorreactor y el contenido se transfirió por drenaje por gravedad. A continuación se inició el agitador y se mantuvo a 45 rpm.

Transferencia de microportadores - 1 l a 3 l. Se usaron los procedimiento en bolsa de Wave enumerados anteriormente con la bolsa de Wave que contenía 2 l de medio y 6 gramos de microportadores vacíos.

Muestreo. Se transfirieron una alícuota de 1 ml de medio y microportadores a un tubo cónico de 15 ml y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se aspiró el medio y se sustituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes, cat. nº L3224) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se aplicó una alícuota de 20 microlitros de la suspensión de células a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron de verde y las células muertas se tiñeron de rojo. Se analizaron manualmente campos microscópicos para evaluar la distribución de células viables adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

Ensayo de glucosa. Se obtuvieron muestras de medio del cultivo y se ensayaron para contenido de glucosa y lactato.

Recogida. Se soldó de forma estéril un recipiente Labtainer BioProcess de 5 l (Hyclone, cat. nº SH30640,01) sobre un puerto de salida unido al biorreactor. El recipiente se posicionó por debajo del biorreactor y el contenido se transfirió por drenaje por gravedad. A continuación se transfirió el contenido del recipiente asépticamente a (3) botellas rotatorias de 750 cm² (Corning LifeSciences, Corning, NY). Se lavaron los microportadores adherentes de células con PBS y se combinaron en una única botella rotatoria. Se incubaron los microportadores con 100 ml de tripsina durante 10 minutos a 37 °C con agitación. Los tubos se enrasaron a 1 l de volumen con PBS y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se recogió por aspiración el sobrenadante que contenía las células y se transfirió a cuatro tubos cónicos de 250 ml cada uno precargado con 10 ml de SBF (dando una disolución al 5 % de SBF para inactivar la tripsina). Todas las células recogidas se centrifugaron, se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía suero y se contaron las células usando un instrumento de PCA de Guava[®].

RESULTADOS

Adición de medio. En el día 15, se añadieron 500 ml de medio al sistema debido a las bajas lecturas de glucosa.

Cinética celular del biorreactor de 3 l. Se calculó el número de células en la siembra a partir de la recogida de células de 1/5 del volumen de microportadores total del matraz con agitación de 250 ml.

Tabla 29. 250 ml previo al biorreactor de 3 l

Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Días	Expansión	Duplicación	Horas/duplicación
		1.10x10 ⁷	0	1		
9	1.10x10 ⁷	8.10x10 ⁷	17	7.36	2.88	141.65

Observaciones y ajustes de RPMA. Se observó la sedimentación de microportadores en el día tres (volumen total 1 l) en el fondo del recipiente de biorreactor. La velocidad del agitador aumentó a 60 rpm. En el día 10 (tres días después de ajustar el volumen total a 3 l) se observó de nuevo la sedimentación de microportadores. La velocidad del agitador se aumentó de nuevo a 85 rpm. En el día de la recogida (día 17) se observó de nuevo la sedimentación de microportadores en el fondo del recipiente del biorreactor.

Recogida de células que volvieron a sembrarse. Se volvieron a sembrar células recogidas del biorreactor a 5.000

células por cm^2 en un matraz T75 y se expandieron hasta confluencia, demostrando la retención de su potencial proliferativo.

La transferencia de células del matraz con agitación de 250 ml al sistema de biorreactor y el aumento de escala de 1 l a 3 l en el día siete se logró sin el uso de tripsina. Esto elimina un producto derivado de animal del procedimiento de expansión de células. Las hUTC lograron 2,88 duplicaciones de la población en este sistema. El consumo de glucosa y la producción de lactato en el biorreactor con el tiempo fueron indicativos de células metabólicamente activas. En la recogida, las células presentes parecieron estar uniformemente distribuidas sobre los microportadores muestreados. Las células recogidas del biorreactor tras volver a sembrarse en condiciones estáticas de cultivo se expandieron hasta confluencia, demostrando retención de la capacidad proliferativa de las células. Este procedimiento demuestra la capacidad de células derivadas de tejido umbilical humanas expandidas para sembrarse, expandirse y recogerse de los microportadores cultivados en un sistema de biorreactor asépticamente cerrado de tres litros con agitación con agitador.

EJEMPLO 8

Expansión de hUTC en medio de crecimiento de suero bovino fetal reducido

El objetivo de este estudio era comparar la cinética de crecimiento y marcadores de la superficie celular de células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) expandidas continuamente cultivadas en medio de crecimiento estándar, que contenían 15 % de suero bovino fetal (SBF), o un medio de crecimiento de suero reducido, que contenía 7,5 % de SBF. La producción de productos de terapia de células hUTC en medio de suero reducido aumentará la seguridad del producto disminuyendo el uso de productos derivados de animal. El uso de medio de suero reducido también reducirá los costes de producción y reducirá el potencial de espumación en biorreactores burbujeados por gas.

Datos generados en ensayos de proliferación en formato de microplacas de hUTC en medio de crecimiento estándar y medio de suero reducido indicaron que las hUTC proliferaron activamente en medio de suero reducido. Como resultado de estos datos de proliferación, se evaluaron la cinética de crecimiento y el fenotipo de expresión de proteínas de la superficie de hUTC durante múltiples pases en condiciones de matraces de cultivo de tejido. Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular inmediatamente matraces T75 que contenían medio de suero estándar o reducido y se cultivaron continuamente durante múltiples pases. La expresión de proteínas de la superficie celular de las células recogidas de cada medio se analizó por citometría de flujo. Adicionalmente, se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular inmediatamente matraces con agitación que contenían microportadores HILLEX[®] II que contenían medio de suero estándar o reducido y se cultivaron continuamente durante múltiples pases.

Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se expandió en matraces T75 duplicados con medio de crecimiento de suero reducido durante once pases. Las horas por duplicación de la población para cada matraz T75 duplicado fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. El análisis estadístico por ANOVA unilateral de todas las horas por duplicación de los puntos de datos de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todos los puntos de datos ($p=0,821$), en comparación con el control del medio de crecimiento estándar. La expresión de proteínas de la superficie celular de hUTC expandidas en medio de suero reducido estuvo de acuerdo con las hUTC expandidas en medio de crecimiento estándar.

Adicionalmente, se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se expandió sobre matraces con agitación que contenían microportadores Hillex II con medio de crecimiento de suero reducido durante tres pases. Las horas por duplicación de la población para cada matraz con agitación fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. Los análisis estadísticos por prueba de la t de dos muestras de las horas promedio por duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC entre los dos medios probados ($p = 0,424$).

Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse en sistemas de cultivo de matraces T estáticos o de microportadores con medio de suero reducido durante múltiples pases de un modo coherente estable, mientras que se mantiene la expresión de proteínas de la superficie celular fenotípica.

El objetivo de este estudio era comparar la cinética de crecimiento y los marcadores de la superficie celular de células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas continuamente cultivadas en medio de crecimiento estándar que contenía 15 % de suero bovino fetal (SBF) y un medio de crecimiento de suero reducido que contenía 7,5 % de SBF. La producción de productos de terapia de células hUTC en un medio de suero reducido aumentará la seguridad del producto disminuyendo el uso de productos derivados de animal. Adicionalmente, el uso de un medio de suero reducido aumentará la eficiencia de producción, reduciendo el coste de materiales y reduciendo el potencial de espumación durante el cultivo en biorreactores burbujeados por gas.

La proliferación de hUTC en un ensayo en formato de microplacas indicó las posibilidades de cultivo continuo en

condiciones de suero reducido. Este ensayo incluyó inicialmente diluciones sucesivas de SBF que oscilaban del 15 % al 0 % en medio de crecimiento basal estándar y en un medio basal de suero reducido alternativo, en un formato de 96 pocillos. Después de cultivar durante 96 horas, se encontró que la proliferación de hUTC para ambos medios basales era mejor en los medios que contenían 15 %, 7,5 % y 3,75 % de SBF. Como resultado, se estableció un

- 5 segundo ensayo en microplaca en un formato de 24 pocillos, usando solo las tres concentraciones de SBF principales para ambos tipos de medio basal. Basándose en la proliferación observada en el formato de 24 pocillos, se inició una comparación de la cinética de crecimiento de hUTC para medio de crecimiento estándar con 15 % de SBF y el medio de crecimiento basal alternativo con 7,5 % de SBF.
- 10 Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular inmediatamente matraces T75 que contenían medio de suero estándar o reducido y se cultivaron continuamente durante múltiples pases. La expresión de proteínas de la superficie celular de las células recogidas de cada medio se analizó por citometría de flujo. Adicionalmente, se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular
- 15 inmediatamente matraces con agitación que contenían microportadores Hillex II que contenían medio de suero estándar o reducido y se cultivaron continuamente durante múltiples pases.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

20 *Células.* Cepa aislada 12034 de células de tejido del cordón umbilical humanas (hUTC) expandidas criopreservadas Duplicación de la población (PD) 12.

25 *Medio de crecimiento (Hayflick).* Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa (Gibco; Grand Island, NY), 15 % de suero bovino fetal (SBF) (HyClone; Logan, UT), penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco; Grand Island, NY), beta-mercaptoetanol (BME) (Sigma; St. Louis, MO)

30 *Medio de suero reducido (DMEM/F12 avanz.).* DMEM/F12 avanzado (Gibco; Grand Island, NY), 7,5 % de suero bovino fetal (SBF), penicilina/estreptomicina (P/S), GlutaMAX™ 4,0 mM (Gibco; Grand Island, NY)

35 *Microplacas de múltiples pocillos.* Microplacas de 96 pocillos y 24 pocillos de cultivo de tejido (Corning, Inc.; Corning, NY) recubiertas con gelatina (Sigma; St. Louis, MO).

Matraces de cultivo de tejido. Matraces T75 (Corning Inc.; Corning, NY) recubiertos con gelatina.

40 *Microportadores.* Se hidrataron microportadores HILLEX® II (Solo Hill; Ann Arbor, MI) en agua DI durante al menos 30 minutos y se esterilizaron en autoclave. Los microportadores HILLEX® II se usaron a una concentración de 12 g/l.

Matraces con agitación. Se usaron matraces con agitación desechables de un solo uso de 100 ml y 500 ml (Corning, Inc.; Corning, NY) como recipientes de cultivo.

45 *Inoculación y cultivo en microplacas de 96 pocillos.* Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se preparó medio de crecimiento usando tanto Hayflick como DMEM/F12 avanz., complementado con 15 %, 7,5 %, 3,75 %, 1,88 %, 0,94 % o 0 % de SBF. Se añadieron 5,00 X 10³ hUTC por pocillo a dos pocillos por condición. Cada pocillo contuvo 250 µl de medio de crecimiento. La placa se cultivó en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, durante 96 horas.

50 *Recogida y recuento de células de microplacas de 96 pocillos.* Se retiró la microplaca de 96 pocillos que contenía células de la incubación y se extrajo el medio por aspiración aséptica. Las células se lavaron con 100 µl de PBS por pocillo; se extrajo la PBS por aspiración aséptica y se añadieron 75 µl de TrypLE™ Select (Gibco; Grand Island, NY). Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, después de lo cual la placa se golpeó ligeramente para desplazar las células. Se añadieron 75 µl de medio apropiado a cada pocillo. Se añadió una adición de 50 µl de reactivo de recuento a cada pocillo. El reactivo de recuento era una disolución de medio de crecimiento apropiado + 2 % de Guava® ViaCount® Flex (Guava Technologies; Hayward, CA) + 2 % de sulfóxido de dimetilo (Guava Technologies; Hayward, CA). Las suspensiones resultantes de células se transfirieron asépticamente a una microplaca de 96 pocillos de agrupación ultra-baja para contar en el instrumento Guava® EasyCyto® (Guava Technologies; Hayward, CA).

55 *Inoculación y cultivo en microplacas de 24 pocillos.* Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se preparó medio de crecimiento usando tanto Hayflick como DMEM/F12 avanz., complementado con 15 %, 7,5 % y 3,75 %. Se añadieron 1,00E+04 hUTC por pocillo a cuatro pocillos por condición. Cada pocillo contuvo 1 ml medio de crecimiento. La placa se cultivó en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, durante 96 horas.

60 *Recogida y recuento de células de microplacas de 24 pocillos.* Se retiró la microplaca de 24 pocillos que contenía células de la incubación y se extrajo el medio por aspiración aséptica. Las células se lavaron con 1 ml de PBS por pocillo; se extrajo PBS por aspiración aséptica y se añadieron 500 µl de TrypLE™ Select. Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, después de lo cual la placa se golpeó ligeramente para desplazar las células. Las

suspensiones de células se pipetearon varios veces y a continuación se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 500 µl de reactivo Guava[®] ViaCount[®] (Guava Technologies, Hayward, CA) para contar en el instrumento de PCA de Guava[®] (Guava Technologies, Hayward, CA).

5 *Inoculación y cultivo en matraces T75.* Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se añadieron 3,75E+05 hUTC a matraces T75 que contenían 15 ml de medio. Los matraces se cultivaron en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, durante tres a cuatro días.

10 *Recogida y pase de células de matraces T75.* Se sacaron matraces T75 que contenían células de la incubación y se extrajo el medio por aspiración aséptica. Las células se lavaron con 5 ml de PBS; se extrajo la PBS por aspiración aséptica y se sustituyó con 1 ml de TrypLE™ Select. Las células se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, después de lo cual los matraces se golpearon ligeramente para desplazar células adherentes. Se añadieron 5 ml de medio a cada matraz y la suspensión de células se transfirió por pipeta a un tubo cónico. Las células se centrifugaron durante 15 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se obtuvo una alícuota para el recuento de células. Después del recuento, se obtuvo una alícuota que se calculó que contenía 3,75E+05 células y se usó para inocular nuevos matraces T75 que contenían medio fresco.

20 *Inoculación y cultivo en matraces con agitación de 100 ml.* Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se añadieron 3,1E+06 hUTC a 1,2 g de HILLEX[®] II (5,0 X 10³ células por cm²) en un matraz con agitación de 100 ml que contenía 100 ml de medio y se puso sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm, de rotación continua. Los matraces con agitación sobre placas con agitación se colocaron en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

25 *Pase de cultivo en matraz con agitación de 100 ml a cultivo en matraz con agitación de 500 ml.* Se retiró un matraz con agitación de 100 ml de su placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el medio de sobrenadante por aspiración y se resuspendió el paquete de microportadores restante con células adherentes en 20 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, los microportadores con células adherentes se transfirieron asépticamente por pipeta a un matraz con agitación de 500 ml que contenía 480 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de microportadores HILLEX[®] II (6 g de contenido de microportadores final o 12 g/l de concentración de microportadores final). A continuación, se colocó el matraz con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm, de rotación continua. Los matraces con agitación sobre placas con agitación se colocaron en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

35 *Pase de un cultivo en matraz con agitación de 500 ml a cinco cultivos en matraz con agitación de 500 ml.* Se retiró un matraz con agitación de 500 ml de su placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el medio de sobrenadante por aspiración y el paquete de microportadores restante con células adherentes se resuspendió en 50 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, una alícuota de 10 ml de los microportadores con células adherentes se transfirió asépticamente por pipeta a cinco matraces con agitación de 500 ml separados, 40 conteniendo cada uno 490 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de microportadores HILLEX[®] II (6 g de contenido de microportadores final o 12 g/l de concentración de microportadores final). A continuación, se colocaron los matraces con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm, de rotación continua. Los matraces con agitación sobre placas con agitación se colocaron en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

45 *Recogida de células adherentes a microportadores HILLEX[®] II.* Se retiró un matraz con agitación de su placa con agitación y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. Se aspiró asépticamente el medio de sobrenadante. Se añadió un volumen de PBS igual al volumen de trabajo del matraz con agitación al matraz con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Tras la sedimentación de los microportadores, se aspiró asépticamente la PBS y se añadió un volumen de TrypLE™ Select igual a 1/5 del volumen de trabajo al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre la placa con agitación durante 10 minutos a 60 rpm, de rotación continua. Se retiró el matraz con agitación de su placa con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Usando una pipeta serológica de 25 ml, la disolución de microportadores/TrypLE™ Select se agitó pipeteando arriba y abajo ~10 veces para disociar las 50 células adherentes residuales de los microportadores. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencias a múltiples tubos cónicos acoplados a filtros de células de 100 µm. Los tubos se llenaron con 5 ml de SBF antes de la recogida de las suspensiones de células. Después de recoger la suspensión de células, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de crecimiento.

60 *Tinción de viabilidad.* Se transfirieron una alícuota de 1 ml de medio y microportadores a un tubo cónico de 15 ml, se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se extrajo el medio por aspiración aséptica y se sustituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes, cat. n° L3224; Carlsbad, CA) y se incubó a partir de 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se aplicó una alícuota de 20 µl a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente: las células viables se tiñeron de verde y las células no viables se tiñeron de rojo. Se analizaron campos microscópicos manualmente para evaluar la distribución de células viables 65

adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

Cifras de células en cultivo - ensayo TrypLE™ Select. Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz con agitación de 100 ml) o 10 ml (matraz con agitación de 500 ml) de suspensión de microportadores homogénea de un recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el medio de sobrenadante por aspiración aséptica. Los microportadores se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración aséptica. Los microportadores se incubaron durante diez minutos a 37 °C en TrypLE™ Select. Después de la incubación, se añadieron 5 ml de PBS y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 1 ml de SBF. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se usó una alícuota para determinar la cifra de células usando un instrumento de PCA de Guava® (Guava Technologies, Hayward, CA).

Citometría de flujo. Se analizaron hUTC recogidas por citometría de flujo usando un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) para determinar el perfil del marcador de la superficie celular usando procedimientos establecidos en la publicación de EE.UU. nº 2005/0054098. Todos los anticuerpos se compraron de BD Pharmingen (San Diego, CA).

RESULTADOS

Tabla 30. Células promedio por pocillo de la cepa aislada de hUTC 120304 en ensayo de proliferación en formato de microplaca de 96 pocillos. Los medios usados fueron Hayflick con SBF diluido sucesivamente y DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM con SBF diluido sucesivamente.

Porcentaje Serum	Adv. DMEM/F12		Hayflick	
	Promedio	Std. Dev.	Promedio	Std. Dev.
0.00%	2661.16	1312.842734	1980.2	937.425602
0.94%	6202.46	3287.721263	3091.395	1430.894211
1.88%	7868.305	1156.451927	4837.44	1898.341291
3.75%	13997.585	3026.211963	8495.72	2900.665154
7.50%	22594.545	3077.802473	10955.07	4451.859442
15.00%	25934.625	2867.961465	19292.82	7723.45867

Tabla 31. Células promedio por pocillo de la cepa aislada de hUTC 120304 en ensayo de proliferación en formato de microplaca de 24 pocillos. Los medios usados fueron Hayflick o DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM con 3,75 %, 7,5 % o 15 % de SBF.

Porcentaje Serum	Adv. DMEM/F12		Hayflick	
	Promedio	Std. Dev.	Promedio	Std. Dev.
15%	91816.75	6584.55	68708.03	3541.25
7.50%	60571.39	4648.66	39028.80	5490.94
3.75%	42613.14	2493.51	21731.38	760.79

Tabla 32. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 1) en DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM + 7,5 % de SBF.

Avanzado DMEM/F12 + 4.00 mM GlutaMAX + 7.5% FBS- Frasco 1							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	4.54E+06	12.11	3.60	3.60	3.00	20.01
2	3.75E+05	3.49E+06	9.31	3.22	6.82	4.00	29.83
3	3.75E+05	1.68E+06	4.48	2.16	8.98	3.00	33.28
4	3.75E+05	2.07E+06	5.51	2.46	11.44	4.00	38.97
5	3.75E+05	1.95E+06	5.21	2.38	13.82	3.00	30.23
6	3.75E+05	2.84E+06	7.57	2.92	16.75	4.00	32.87
7	3.75E+05	1.42E+06	3.79	1.92	18.67	3.00	37.48
8	3.75E+05	1.44E+06	3.84	1.94	20.61	4.00	49.46
9	3.75E+05	1.91E+06	5.09	2.35	22.96	4.00	40.88
10	3.75E+05	1.05E+06	2.80	1.49	24.44	4.00	64.63
11	3.75E+05	1.77E+06	4.72	2.24	26.68	3.00	32.16

Tabla 33. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 2) en DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM + 7,5 % de SBF.

Avanzado DMEM/F12 + 4.00 mM GlutaMAX + 7.5% FBS- Frasco 2							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	3.87E+06	10.32	3.37	3.37	3.00	21.38
2	3.75E+05	3.62E+06	9.65	3.27	6.64	4.00	29.35
3	3.75E+05	2.01E+06	5.36	2.42	9.06	3.00	29.72
4	3.75E+05	2.21E+06	5.89	2.56	11.62	4.00	37.52
5	3.75E+05	2.04E+06	5.43	2.44	14.06	3.00	29.50
6	3.75E+05	2.21E+06	5.89	2.56	16.62	4.00	37.51
7	3.75E+05	2.17E+06	5.79	2.53	19.15	3.00	28.43
8	3.75E+05	3.09E+06	8.24	3.04	22.19	4.00	31.55
9	3.75E+05	2.39E+06	6.37	2.67	24.87	4.00	35.93
10	3.75E+05	1.71E+06	4.56	2.19	27.06	4.00	43.85
11	3.75E+05	7.57E+05	2.02	1.01	28.07	3.00	71.05

ES 2 524 443 T3

Tabla 34. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 3) en DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM + 7,5 % de SBF

Avanzado DMEM/F12 + 4.00 mM GlutaMAX + 7.5% FBS- Frasco 3							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	4.08E+06	10.88	3.44	3.44	3.00	20.91
2	3.75E+05	3.54E+06	9.44	3.24	6.68	4.00	29.64
3	3.75E+05	2.37E+06	6.32	2.66	9.34	3.00	27.07
4	3.75E+05	2.10E+06	5.60	2.48	11.83	4.00	38.64
5	3.75E+05	2.45E+08	8.53	2.71	14.53	3.00	26.60
6	3.75E+05	3.84E+06	10.24	3.36	17.89	4.00	28.60
7	3.75E+05	2.83E+06	7.55	2.92	20.81	3.00	24.69
8	3.75E+05	3.22E+06	8.59	3.10	23.91	4.00	30.95
9	3.75E+05	1.84E+06	4.91	2.29	26.20	4.00	41.83
10	3.75E+05	1.95E+06	5.20	2.38	28.58	4.00	40.36
11	3.75E+05	1.03E+06	2.75	1.46	30.04	3.00	49.39

Tabla 35. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 1) en medio de crecimiento

Medio de Crecimiento - Frasco 1							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	3.12E+06	8.32	3.06	3.06	3.00	23.56
2	3.75E+05	4.72E+06	12.59	3.65	6.71	4.00	26.27
3	3.75E+05	1.87E+06	4.99	2.32	9.03	3.00	31.06
4	3.75E+05	2.66E+06	7.09	2.83	11.85	4.00	33.97
5	3.75E+05	1.84E+06	4.89	2.29	14.15	3.00	31.43
6	3.75E+05	4.23E+06	11.28	3.50	17.64	4.00	27.46
7	3.75E+05	1.55E+06	4.13	2.05	19.69	3.00	35.17
8	3.75E+05	1.97E+06	5.25	2.39	22.08	4.00	40.11
9	3.75E+05	2.20E+06	5.87	2.55	24.63	4.00	37.61
10	3.75E+05	2.04E+06	5.44	2.44	27.08	4.00	39.29
11	3.75E+05	1.69E+06	4.51	2.17	29.25	3.00	33.15

Tabla 36. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 2) en medio de crecimiento

Media de Crecimiento - Frasco 2							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	4.27E+06	11.39	3.51	3.51	3.00	20.52
2	3.75E+05	3.60E+06	9.60	3.26	6.77	4.00	29.42
3	3.75E+05	2.88E+06	7.68	2.94	9.71	3.00	24.48
4	3.75E+05	2.88E+06	7.67	2.94	12.65	4.00	32.66
5	3.75E+05	1.95E+06	5.21	2.38	15.03	3.00	30.24
6	3.75E+05	3.65E+06	9.73	3.28	18.32	4.00	29.24
7	3.75E+05	1.45E+06	3.87	1.95	20.27	3.00	36.90
8	3.75E+05	1.71E+06	4.56	2.19	22.46	4.00	43.85
9	3.75E+05	1.91E+06	5.09	2.35	24.81	4.00	40.88
10	3.75E+05	2.90E+06	7.73	2.95	27.76	4.00	32.53
11	3.75E+05	9.67E+05	2.58	1.37	29.12	3.00	52.68

Tabla 37. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en T75 (matraz 2) en medio de crecimiento

Media de Crecimiento - Frasco 3							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/duplicación
0		3.75E+05	1.00				
1	3.75E+05	3.61E+06	9.63	3.27	3.27	3.00	22.04
2	3.75E+05	3.24E+06	8.64	3.11	6.38	4.00	30.86
3	3.75E+05	2.92E+06	7.79	2.96	9.34	3.00	24.32
4	3.75E+05	2.64E+06	7.05	2.82	12.16	4.00	34.07
5	3.75E+05	1.67E+06	4.45	2.15	14.31	3.00	33.45
6	3.75E+05	4.58E+06	12.21	3.61	17.92	4.00	26.59
7	3.75E+05	8.95E+05	2.39	1.25	19.17	3.00	57.37
8	3.75E+05	2.16E+06	5.76	2.53	21.70	4.00	38.00
9	3.75E+05	1.93E+06	5.15	2.36	24.06	4.00	40.62
10	3.75E+05	3.85E+06	10.27	3.38	27.42	4.00	28.57
11	3.75E+05	7.07E+05	1.89	0.91	28.34	3.00	78.70

Tabla 38. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en matraces con agitación en DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM + 7,5 % de SBF

Avanzado DMEM/F12 + 4.00 mM GlutaMAX + 7.5% FBS- En cultivo de frasco giratorio							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
0		1.91E+06	1.00				
1	1.91E+06	7.70E+06	4.03	2.01	2.01	3.00	35.80
2	7.70E+06	8.59E+07	11.15	3.48	5.49	4.00	27.59
3	1.72E+07	1.02E+08	5.91	2.56	8.05	4.00	37.45

Tabla 39. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en matraces con agitación en medio de crecimiento

Media de Crecimiento - En cultivo de frasco giratorio							
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Expansión	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
0		1.98E+06	1.00				
1	1.98E+06	5.82E+06	2.94	1.56	1.56	3.00	46.29
2	5.82E+06	5.10E+07	8.76	3.13	4.69	4.00	30.66
3	1.02E+07	5.76E+07	5.65	2.50	7.19	4.00	38.43

Tabla 40. Comparación de la expresión de proteínas de la superficie celular por hUTC expandidas en DMEM/F12 avanzado + GlutaMAX® 4,00 mM + 7,5 % de SBF o medio de crecimiento.

Fabricante de superficie celular	Media de crecimiento	Avanzado	DMEM/F12
CD10	(+)		(+)
CD13	(+)		(+)
CD31	(-)		(-)
CD34	(-)		(-)
CD44	(+)		(+)
CD45	(-)		(-)
CD73	(+)		(+)
CD90	(+)		(+)
CD117	(-)		(-)
CD140	(-)		(-)
HLA-A,B,C	(+)		(+)
HLA-DQ,DP,DR	(-)		(-)

Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se expandió en matraces T75 duplicados con medio de crecimiento de suero reducido durante once pases. Las horas por duplicación de la población para cada matraz T75 duplicado fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. Los análisis estadísticos por ANOVA unilateral de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todos los puntos de datos (p=0,821). La expresión de proteínas de la superficie celular de hUTC expandidas en medio de suero reducido estuvo de acuerdo

con las hUTC expandidas en medio de crecimiento estándar.

Por tanto, se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se expandió sobre matraces con agitación que contenían microportadores Hillex II con medio de crecimiento de suero reducido durante tres pases. Las horas por duplicación de la población para cada matraz con agitación fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. Los análisis estadísticos por prueba de la t de dos muestras de las horas promedio por duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC entre los dos medios probados ($p=0,424$).

Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse en sistemas de cultivo de matraces T estáticos o de microportadores con medio de suero reducido durante múltiples pases de un modo coherente estable y mantener su expresión de proteínas de la superficie celular fenotípica.

EJEMPLO 9

Expansión de microportadores HILLEX® II de hUTC en un biorreactor de 3 l

El objetivo de este estudio era expandir células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) adherentes a microportadores HILLEX® II en un biorreactor a escala de laboratorio durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre HILLEX® II durante múltiples duplicaciones de la población en un biorreactor a escala de laboratorio servirá de sistema de bioprocesamiento modelo para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se usó la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 expandida a aproximadamente el 70 % de confluencia sobre microportadores HILLEX® II en un matraz con agitación de 500 ml para inocular un biorreactor de 3 l que contenía medio adicional y microportadores HILLEX® II. Las células se cultivaron en el biorreactor durante cinco días tomándose alícuotas para calcular una cifra de células a mitad de proceso.

Las hUTC lograron aproximadamente seis duplicaciones de la población en cinco días. Las horas por duplicación de la población fueron indicativas de crecimiento logarítmico estable. El pH del sistema se mantuvo satisfactoriamente a 7,0 por una cubierta de aire con CO₂ y sin burbujeo. El DO del sistema se mantuvo satisfactoriamente al 40 % por una cubierta de aire con oxígeno y sin burbujeo.

Estos datos demuestran la capacidad de hUTC para expandirse sobre HILLEX® II en un biorreactor a escala de laboratorio. Este sistema de bioprocesamiento modelo puede aumentarse de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

El objetivo de este estudio era expandir células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) adherentes a microportadores HILLEX® II en un biorreactor a escala de laboratorio durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre HILLEX® II durante múltiples duplicaciones de la población en un biorreactor a escala de laboratorio servirá de sistema de bioprocesamiento modelo para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se usó la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 expandida a aproximadamente el 70 % de confluencia sobre microportadores HILLEX® II en un matraz con agitación de 500 ml para inocular un biorreactor de 3 l que contenían medio adicional y microportadores HILLEX® II. Las células se cultivaron en el biorreactor durante cinco días tomándose alícuotas para calcular una cifra de células a mitad de proceso.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Se usó la cepa aislada CNTO 2476 de células de tejido del cordón umbilical humanas (hUTC) expandidas criopreservadas lote 25126078 PD 7.

Medios de crecimiento. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa sin rojo de fenol (Gibco-Grand Island, NY), 15 % de suero bovino fetal (SBF) (HyClone- Logan UT), GlutaMAX® 4,00 mM (Gibco- Grand Island, NY)

Reactivo de recogida. 1x TrypLE™ Select (Gibco- Grand Island, NY), 10x TrypLE™ Select (Gibco- Grand Island, NY)

Microportadores. Se hidrataron microportadores HILLEX® II (SoloHill Inc.- Ann Arbor, MI) en agua DI durante al menos 30 minutos y se esterilizaron en autoclave. Los microportadores HILLEX® II se usaron a una concentración de 12 g/l.

Biorreactor. Biorreactor con camisa de 3 l (Applikon, Inc., Foster City, CA) con un controlador B-DCU (Sartorius BBI, Bethlehem, PA).

Inoculación en biorreactor. Se transfirieron asépticamente 6 g de microportadores con células unidas a aproximadamente el 70 % de confluencia producidas de un matraz con agitación de 500 ml a un biorreactor de 3 l

que contenía 30 g de HILLEX® II y aproximadamente 2 l de medio de crecimiento. A continuación se añadió medio de crecimiento adicional para llevar el volumen final a 3 l.

5 *Parámetros del biorreactor.* El agitador del biorreactor se fijó a 85-100 rpm. El punto de ajuste del pH fue 7,0 y se controló con adición de CO₂. Se dejó que el oxígeno disuelto (DO) descendiera del 100 % al 40 % de punto de ajuste de DO y se mantuvo por adición de oxígeno. La cubierta de aire se fijó a 50 cm³ y no se usó burbujeo.

10 *Recogida de células adherentes a microportadores HILLEX® II.* Se apagó el agitador del biorreactor y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. El sobrenadante del medio se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. Se bombearon 3 l de PBS en el biorreactor y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante de PBS se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. A continuación se bombearon 500 ml de 1x TrypLE™ Select y 50 ml de 10x TrypLE™ Select en el biorreactor. El agitador del biorreactor se ajustó durante 10 minutos a 65 rpm. Se apagó el agitador y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante que contenía células se bombeó fuera mediante un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados en un recipiente de transferencia precargado con una pequeña cantidad de SBF. A continuación se bombeó 1 l de PBS en el biorreactor para resuspender cualquier célula restante. El sobrenadante que contenía células se bombeó fuera mediante un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados en un recipiente de transferencia precargado con SBF. Todo el sobrenadante que contenía células se transfirió a múltiples tubos cónicos de 500 ml. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se obtuvo una alícuota para el recuento de células.

25 *Cifras de células en cultivo - Ensayo TrypLE™.* Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz con agitación de 100 ml) o 10 ml (matraz con agitación de 500 ml) de suspensión de microportadores homogénea del recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante por aspiración. Los microportadores se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Los microportadores se incubaron durante diez minutos a 37 °C en TrypLE™ Select. Después de la incubación se añadieron 5 ml de PBS y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. El sobrenadante que contenía células se recoge por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 1 ml de SBF. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se usó una alícuota para determinar la cifra de células.

35 **RESULTADOS**

Tabla 41. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 sobre microportadores HILLEX® II.

40

CNTO 2476 en HILLEX II						
alícuota	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
45 inoculación		7.99E+06				
Media ejecución muestra	7.99E+06	7.47E+07	3.22	3.22	3.00	22.33
50 Media ejecución muestra	7.47E+07	2.88E+08	1.94	5.17	1.00	12.34
cosecha	2.88E+08	6.15E+08	1.10	6.27	1.00	21.89

55 Se usó la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 adherente al 70 % de confluencia a 6 g de HILLEX® II para inocular un biorreactor de 3 l. El pH del sistema se mantuvo satisfactoriamente a 7,0 por una cubierta de aire con CO₂ y sin burbujeo. El DO del sistema se mantuvo satisfactoriamente al 40 % por cubierta de aire con oxígeno y sin burbujeo. Las hUTC lograron aproximadamente seis duplicaciones de la población en cinco días. Las horas por duplicación de la población fueron indicativas de crecimiento logarítmico estable. Estos datos demuestran la capacidad de hUTC para expandirse sobre HILLEX® II en un biorreactor a escala de laboratorio. Este sistema de bioprocesamiento modelo puede aumentarse de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

65 **EJEMPLO 10**

Expansión de hUTC sobre microportadores HILLEX® II a concentraciones de 12-24 gramos/litro

El objetivo de este estudio era cultivar continuamente células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas adherentes a microportadores HILLEX® II a múltiples concentraciones de microportador en matraces con agitación. La capacidad para expandir hUTC sobre microportadores a diversas concentraciones de microportador proporcionará mayor flexibilidad y opciones para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular inmediatamente matraces con agitación que contenían microportadores HILLEX® II a concentraciones de 12, 16, 20 ó 24 g/l y se cultivaron continuamente durante múltiples pases.

Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC 120304 criopreservada a duplicación de la población 12,8 y se expandió sobre microportadores HILLEX® II durante siete pases. Las horas por duplicación de la población para cada concentración de microportador fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. Los análisis estadísticos por ANOVA unilateral de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas ($p=0,277$). Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse durante siete pases sobre microportadores de un modo coherente estable.

El objetivo de este estudio era cultivar continuamente células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas adherentes a microportadores HILLEX® II a múltiples concentraciones de microportador en matraces con agitación. La capacidad para expandir hUTC sobre microportadores a diversas concentraciones de microportador proporcionará mayor flexibilidad y opciones para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se descongeló la cepa aislada de hUTC criopreservada 120304 y se usó para inocular inmediatamente matraces con agitación que contenían microportadores HILLEX® II a concentraciones de 12, 16, 20 ó 24 g/l y se cultivaron continuamente durante múltiples pases.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Cepa aislada 12034 de células de tejido del cordón umbilical humanas (hUTC) expandidas criopreservadas Duplicación de la población (PD) 12.

Medios de crecimiento. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa (Gibco- Grand Island, NY), 15 % de suero bovino fetal (SBF) (HyClone- Logan UT), penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco- Grand Island, NY), beta-mercaptoetanol (BME) (Sigma-St. Louis, MO).

Microportadores. Se hidrataron microportadores HILLEX® II en agua DI durante al menos 30 minutos y se esterilizaron en autoclave. Los microportadores HILLEX® II se usaron a una concentración de 12, 16, 20 y 24 g/l (1 g de HILLEX® II = 515 cm² de área superficial).

Matraz con agitación. Se usaron matraces con agitación de 100 ml y de 500 ml desechables de un solo uso (Corning, Inc.- Corning, NY).

Inoculación y cultivo en matraz con agitación de 100 ml. Se cargaron matraces con agitación de 100 ml con 100 ml de medio de crecimiento y concentración apropiada de microportadores para lograr 12, 16, 20 ó 24 gramos de HILLEX® II por litro. Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se añadieron números de células apropiados a cada matraz con agitación de 100 ml para lograr 5,0 X 10³ células por cm². Se colocaron matraces con agitación cargados de células sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Las placas con agitación se colocaron en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

Pase del cultivo de un matraz con agitación de 100 ml a un matraz con agitación de 500 ml. Se retiró el matraz con agitación de 100 ml de la placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. El paquete de microportadores restante con células adherentes se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, los microportadores con células adherentes se transfirieron asépticamente por pipeta a un matraz con agitación de 500 ml que contenía 480 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de HILLEX® II (6 g de contenido de microportadores final) o 1,2 g de Cytodex® 1 (1,5 g de contenido de microportadores final). A continuación se colocó el matraz con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Se colocaron las placas con agitación en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

Pase de cultivo de un matraz con agitación de 100 ml a un matraz con agitación de 100 ml. Se retiró el matraz con agitación de 100 ml de la placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. El paquete de microportadores restante con células adherentes se resuspendió en 50 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, alícuotas de 10 ml de los microportadores con células adherentes se transfirieron asépticamente por pipeta a un matraz con agitación separado de 100 ml conteniendo cada uno 90 ml de medio de crecimiento fresco y 0,96 g de HILLEX® II (1,2 g de contenido de microportadores final). A continuación se colocaron los matraces con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Se colocaron las placas con agitación en estufas de incubación de cultivo de tejido con

5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

Recogida de células adherentes a microportadores HILLEX® II. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. Se añadió un volumen de PBS igual al volumen de trabajo del matraz con agitación al matraz con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se añadió un volumen de TrypLE™ Select igual a 1/5 del volumen de trabajo al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre la placa con agitación durante 10 minutos a 60 rpm. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Usando una pipeta serológica de 25 ml, la disolución de microportadores/TrypLE™ Select se agitó pipeteando arriba y abajo ~10 veces para disociar las células adherentes residuales de los microportadores. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 5 ml de SBF y una unidad de filtración de 100 µm insertada en la abertura del tubo. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de crecimiento.

Tinción de viabilidad. Se transfirieron una alícuota de 1 ml de medio y microportadores a un tubo cónico de 15 ml y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se extrajo el medio por aspiración y se sustituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes, cat. nº L3224) y se incubó a partir de 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se aplicó una alícuota de 20 µl a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron de verde. Se analizaron campos microscópicos manualmente para evaluar la distribución de células viables adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

Cifras de células en cultivo - ensayo TrypLE™ Select. Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz con agitación de 100 ml) o 10 ml (matraz con agitación de 500 ml) de suspensión de microportadores homogénea del recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante por aspiración. Los microportadores se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Los microportadores se incubaron durante diez minutos a 37 °C en TrypLE™ Select. Después de la incubación, se añadieron 5 ml de PBS y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 1 ml de SBF. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se usó una alícuota para determinar la cifra de células usando un instrumento de PCA de Guava® (Guava Technologies, Hayward, CA).

RESULTADOS

Tabla 42. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre 12 g/l de microportadores HILLEX® II

12 g/L Hillex II						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
1		5.15E+06		12.00		
2	1.03E+06	1.78E+07	4.11	16.11	4.00	23.37
3	3.55E+06	2.23E+07	2.65	18.76	3.00	27.19
4	4.45E+06	2.95E+07	2.73	21.48	4.00	35.18
5	5.90E+06	1.53E+07	1.37	22.86	3.00	52.37
6	3.06E+06	1.30E+07	2.09	24.95	4.00	46.00
7	1.23E+07	3.46E+07	1.49	26.44	3.00	48.25

Tabla 43. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre 16 g/l de microportadores HILLEX® II

16g/L Hillex II						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
1		4.05E+06		12.00		
2	8.10E+05	7.80E+06	3.27	15.27	4.00	29.38
3	1.56E+06	8.74E+06	2.49	17.75	3.00	28.97
4	1.75E+06	1.93E+07	3.47	21.22	4.00	27.70
5	3.86E+06	1.85E+07	2.26	23.48	3.00	31.85
6	3.70E+06	1.54E+07	2.06	25.54	4.00	46.66
7	1.46E+07	4.70E+07	1.69	27.22	3.00	42.69

Tabla 44. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre 20 g/l de microportadores HILLEX® II

20g/L Hillex II						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
1		4.39E+06		12.00		
2	8.78E+05	1.23E+07	3.81	15.81	4.00	25.18
3	2.47E+06	1.19E+07	2.27	18.08	3.00	31.72
4	2.38E+06	1.78E+07	2.90	20.99	4.00	33.05
5	3.56E+06	1.66E+07	2.22	23.21	3.00	32.41
6	3.32E+06	2.04E+07	2.62	25.83	4.00	36.65
7	1.94E+06	3.86E+07	4.31	30.14	3.00	16.69

Tabla 45. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre 24 g/l de microportadores HILLEX® II

24g/L Hillex II								
	Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación	Tiempo total
5	1		7.49E+06		12.00			0.00
10	2	1.50E+06	2.25E+07	3.91	15.91	4.00	24.56	4.00
	3	4.50E+06	1.74E+07	1.95	17.86	3.00	36.94	7.00
15	4	3.48E+06	1.17E+07	1.75	19.61	4.00	54.81	11.00
	5	2.34E+06	9.84E+06	2.07	21.68	3.00	34.75	14.00
	6	1.97E+06	1.08E+07	2.46	24.14	4.00	39.08	18.00
20	7	1.03E+07	3.21E+07	1.64	25.78	3.00	43.87	21.00

Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC 120304 criopreservada a duplicación de la población 12,8 y se expandió sobre microportadores HILLEX® II durante siete pases. Las horas por duplicación de la población para cada concentración de microportador fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable. Los análisis estadísticos por ANOVA unilateral de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas ($p=0,277$). Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse durante siete pases sobre microportadores de un modo coherente estable.

EJEMPLO 11**Expansión de hUTC sobre microportadores en cultivo continuo en matraz con agitación**

El objetivo de este estudio era cultivar continuamente células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas adherentes a microportadores comerciales en matraces con agitación durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre microportadores durante múltiples duplicaciones de la población servirá de modelo sistema para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se evaluaron dos cepas aisladas de hUTC, 120304- aislada, expandida y criopreservada bajo condiciones de investigación, y CNTO 2476- aislada, expandida y criopreservada bajo condiciones de GMP. También se evaluaron los microportadores comerciales Cytodex® 1 o HILLEX® II. Se descongelaron las células criopreservadas y se usaron para inocular inmediatamente cultivos en matriz con agitación. Las células se cultivaron continuamente durante múltiples pases hasta que la célula alcanzó aproximadamente la duplicación de la población 30. También se cultivaron hUTC estáticamente en matraces T225 como control.

Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC 120304 criopreservada a duplicación de la población 12,8 y se expandió sobre microportadores Cytodex® 1 y HILLEX® II a duplicación de la población 28,6 y 28,7, respectivamente. Las horas por duplicación de la población fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable y estuvieron de acuerdo con la cinética de crecimiento en matraces T. Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC 120304 criopreservada a duplicación de la población 22,6 y se expandió sobre microportadores Cytodex® 1 y HILLEX® II a duplicación de la población 33,2 y 31,0, respectivamente. Las horas por duplicación de la población fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable y también estuvieron de acuerdo con la cinética de crecimiento en matraces T. Los análisis estadísticos por ANOVA unilateral de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas ($p=0,988$). También permaneció coherente la expresión de proteínas de la superficie celular en la recogida final para todas las condiciones probadas.

Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse a aproximadamente 30 duplicaciones de la población sobre microportadores de un modo coherente estable que mantiene el fenotipo de las proteínas de la superficie celular. Este sistema modelo puede aumentarse de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

El objetivo de este estudio era cultivar continuamente células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) expandidas adherentes a microportadores comerciales en matraces con agitación durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre microportadores durante múltiples duplicaciones de la

población servirá de sistema modelo para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se evaluaron dos cepas aisladas de hUTC, 120304 aislada, expandida y criopreservada bajo condiciones de investigación, y CNTO 2476 aislada, expandida y criopreservada bajo condiciones de GMP. Los microportadores comerciales evaluados fueron Cytodex[®] 1 o HILLEX[®] II. Se descongelaron las células criopreservadas y se usaron para inocular inmediatamente cultivos en matriz con agitación. Las células se cultivaron continuamente durante múltiples pases hasta que la célula alcanzó la duplicación de la población. También se cultivaron hUTC estáticamente en matraces T225 como control.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Se usaron la cepa aislada 12034 de células de tejido del cordón umbilical humanas (hUTC) expandidas criopreservadas, duplicación de la población (PD) 12 y la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 lote 25126078 PD 22.

Medios de crecimiento. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa (Gibco- Grand Island, NY), 15 % de suero bovino fetal (SBF) (HyClone- Logan UT), penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco- Grand Island, NY), beta-mercaptoetanol (BME) (Sigma-St. Louis, MO)

Microportadores. Se hidrataron microportadores Cytodex[®] 1 (GE Health Sciences- Piscataway, NJ) en PBS durante al menos 3 horas y se esterilizaron en autoclave. Se usaron los microportadores Cytodex[®] 1 a una concentración de 3 g/l. Se hidrataron microportadores HILLEX[®]II (SoloHill Inc.- Ann Arbor, MI) en agua desionizada durante al menos 30 minutos y se esterilizaron en autoclave. Se usaron los microportadores HILLEX[®] II a una concentración de 12 g/l.

Matraz con agitación. Se usaron matraces con agitación de 100 ml y 500 ml desechables de un solo uso (Corning, Inc.- Corning, NY).

Inoculación y cultivo en matraz con agitación de 100 ml. Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Se añadieron $6,6 \times 10^6$ hUTC a 3000 mg de Cytodex[®] 1 ($5,0 \times 10^3$ células por cm^2) en un matraz con agitación de 100 ml que contenía 100 ml de medio y se colocaron sobre estufas de incubación de cultivo de tejido a 37 °C y se incubó durante tres a cuatro días. Placas con agitación se fijaron a 60 rpm de rotación continua. Se añadieron $3,1 \times 10^6$ hUTC a 1,2 g de HILLEX[®] II ($5,0 \times 10^3$ células por cm^2) en un matraz con agitación de 100 ml que contenía 100 ml de medio y se colocaron sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Se colocaron las placas con agitación en 5 % de CO₂.

Pase de cultivo de un matraz con agitación de 100 ml a un matraz con agitación de 500 ml. Se extrajo el matraz con agitación de 100 ml de la placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. El paquete de microportadores restante con células adherentes se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, los microportadores con células adherentes se transfirieron asépticamente por pipeta a un matraz con agitación de 500 ml que contenía 480 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de HILLEX[®] II (6 g de contenido de microportadores final) o 1,2 g de Cytodex[®] 1 (1,5 g de contenido de microportadores final). A continuación se colocó el matraz con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Se colocaron las placas con agitación en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

Pase de cultivo de un matraz con agitación de 500 ml a cinco matraces con agitación de 500 ml. Se retiró el matraz con agitación de 500 ml de la placa con agitación y se dejó que sedimentaran los microportadores. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. El paquete de microportadores restante con células adherentes se resuspendió en 50 ml de medio de crecimiento fresco. A continuación, cinco alícuotas de 10 ml separadas de los microportadores con células adherentes se transfirieron asépticamente por pipeta a cinco matraces con agitación de 500 ml separados conteniendo cada uno 490 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de HILLEX[®] II (6 g de contenido de microportadores final) o 1,2 g de Cytodex[®] 1 (1,5 g de contenido de microportadores final). A continuación se colocaron los matraces con agitación sobre una placa con agitación fijada a 60 rpm de rotación continua. Se colocaron las placas con agitación en estufas de incubación de cultivo de tejido con 5 % de CO₂, 37 °C, y se incubaron durante tres a cuatro días.

Recogida de células adherentes a microportadores Cytodex[®] 1. Se retiró el matraz con agitación de 500 ml de la placa con agitación y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Se añadieron 500 ml de DMEM-baja glucosa al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre placa con agitación durante 20 minutos a 60 rpm. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante de DMEM-baja glucosa por aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre placa con agitación durante 20 minutos a 60 rpm. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Se añadieron 250 ml de TrypLE™ Select al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre placa con agitación durante 10 minutos a 60 rpm. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los

microportadores sedimentaran por gravedad. Usando una pipeta serológica de 50 ml, la disolución de microportadores-TrypLE™ Select se agitó por pipeteando arriba y abajo ~10 veces para disociar las células adherentes residuales de los microportadores. A continuación se añadieron 250 ml de PBS al matraz con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 5 ml de SBF y una unidad de filtración de 100 µm insertada en la abertura del tubo. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de crecimiento.

Recogida de células adherentes a microportadores HILLEX® II. Se retiró el matraz con agitación de 500 ml de la placa con agitación y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. Se extrajo el sobrenadante del medio por aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Se añadieron 100 ml de TrypLE™ Select al matraz con agitación. A continuación se incubó el matraz con agitación sobre placa con agitación durante 10 minutos a 60 rpm. Se retiró el matraz con agitación de la placa con agitación y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. Usando una pipeta serológica de 25 ml, la disolución de microportadores/TrypLE™ Select se agitó pipeteando arriba y abajo ~10 veces para disociar las células adherentes residuales de los microportadores. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 5 ml de SBF y una unidad de filtración de 100 µm insertada en la abertura del tubo. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de crecimiento.

Tinción de viabilidad. Se transfirieron una alícuota de 1 ml de medio y microportadores a un tubo cónico de 15 ml y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se extrajo el medio por aspiración y se substituyó con 1 ml de disolución de tinción Live/Dead (Molecular Probes cat. nº L3224) y se incubó a partir de 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se aplicó una alícuota de 20 µl a un portaobjetos de microscopio de vidrio y se observó por microscopía fluorescente. Las células vivas se tiñeron de verde. Se analizaron campos microscópicos manualmente para evaluar la distribución de células viables adheridas a los microportadores. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

Cifras de células en cultivo - Ensayo de liberación de núcleos. Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz con agitación de 100 ml) o 10 ml (matraz con agitación de 500 ml) de suspensión de microportadores homogénea de un recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante por aspiración. Los microportadores se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Los microportadores se incubaron durante una hora a 37 °C en disolución de liberación de núcleos (ácido cítrico 0,1 M (Sigma- St. Louis, MO) que contenía 0,1 % en peso/volumen de cristal violeta (Sigma- St. Louis, MO)). Después de la incubación se añadió una alícuota de 100 µl de la disolución de liberación de núcleos que contenía microportadores a 100 µl de PBS. A continuación se cargó una alícuota de 10 µl de esta disolución en un hemocitómetro y se contaron los núcleos liberados.

Cifras de células in cultivo – Ensayo de TrypLE™. Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz con agitación de 100 ml) o 10 ml (matraz con agitación de 500 ml) de suspensión de microportadores homogénea de un recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante por aspiración. Los microportadores se lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Los microportadores se incubaron durante diez minutos a 37 °C en TrypLE™ Select. Después de la incubación se añadieron 5 ml de PBS y se dejó que los microportadores se separaran por gravedad. Se recogió el sobrenadante que contenía células por pipeteado repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 1 ml de SBF. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se usó una alícuota para determinar la cifra de células usando un instrumento de PCA de Guava® (Guava Technologies, Hayward, CA).

Cultivo en matraces T estáticos. Se descongelaron viales criopreservados de hUTC, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento. Las células se cultivaron estáticamente en T225 durante múltiples pases usando procedimientos establecidos en el documento US2005/0054098.

Citometría de flujo. Se analizaron hUTC recogidas por citometría de flujo usando un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) para determinar el perfil del marcador de la superficie celular usando procedimientos establecidos en el documento US2005/0054098. Todos los anticuerpos se compraron de BD Pharmingen (San Diego, CA).

RESULTADOS

Tabla 46. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre microportadores Cytodex® 1.

120304- Cytodex 1						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación
Semilla		5.32E+06	2.03E+00	1.28E+01		
6	5.32E+06	4.71 E+07	3.15E+00	1.59E+01	4.00	30.51
7	8.96E+06	7.30E+07	3.03E+00	1.89E+01	3.00	23.79
8	6.60E+06	3.30E+07	2.32E+00	2.12E+01	3.00	31.01
9	6.60E+06	3.90E+07	2.56E+00	2.38E+01	3.00	28.09
10	3.90E+07	2.17E+08	2.48E+00	2.63E+01	4.00	38.77
11	2.17E+08	1.10E+09	2.34E+00	2.86E+01	4.00	41.00

Tabla 47. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 sobre microportadores HILLEX® II.

120304- Hillex II						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación
6 (Semilla)		5.32E+06	2.03E+00	1.28E+01		
6	5.32E+06	4.71E+07	3.15E+00	1.59E+01	4.00	30.51
7	8.96E+06	7.30E+07	3.03E+00	1.89E+01	3.00	23.79
8	3.00E+06	1.90E+07	2.66E+00	2.16E+01	3.00	27.04
9	3.80E+06	2.30E+07	2.60E+00	2.42E+01	3.00	27.72
10	2.30E+07	2.64E+08	3.52E+00	2.77E+01	4.00	27.27
11	2.11E+08	4.16E+08	9.79E-01	2.87E+01	3.00	73.52

Tabla 48. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 sobre microportadores Cytodex® 1

CNTO 2476- Cytodex 1						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación
6 (Semilla)		6.30E+05		2.26E+01		
6	6.30E+05	3.44E+06	2.45E+00	2.50E+01	3.00	29.40
7	3.44E+06	5.20E+07	3.92E+00	2.90E+01	4.00	24.50
8	4.00E+07	1.60E+08	2.00E+00	3.10E+01	3.00	36.00
8	1.60E+08	7.67E+08	2.26E+00	3.32E+01	4.00	42.46

Tabla 49. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 sobre microportadores HILLEX® II

CNTO 2476- Hillex II						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación
6 (Semilla)		1.68E+06		2.26E+01		
6	1.68E+06	1.29E+07	2.94E+00	2.55E+01	4.00	32.64
7	1.29E+07	5.30E+07	2.04E+00	2.76E+01	3.00	35.32
8	5.30E+07	5.60E+08	3.40E+00	3.10E+01	5.00	35.28

Tabla 50. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC 120304 en matraces T225.

120304 T225 frasco						
Pasaje	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas/Duplicación
6 (Semilla)		1.12E+07	2.03E+00	1.28E+01		
6	1.12E+07	3.05E+07	1.45E+00	1.42E+01	2.00	33.21
7	2.20E+06	2.03E+07	3.21E+00	1.74E+01	4.00	29.94
8	3.75E+05	1.50E+06	2.00E+00	1.94E+01	3.00	36.00
9	3.75E+05	1.85E+06	2.30E+00	2.17E+01	4.00	41.69
10	3.75E+05	2.39E+06	2.67E+00	2.44E+01	3.00	26.95
11	7.50E+05	3.14E+06	2.07E+00	2.64E+01	4.00	46.47
12	3.14E+06	2.02E+07	2.69E+00	2.91E+01	3.00	26.81
131	2.02E+07	1.14E+08	2.50E+00	3.16E+01	4.00	38.45

Tabla 51. Comparación de la expresión de proteínas de la superficie celular por hUTC expandidas sobre microportador y matraces T y analizada por citometría de flujo.

Fabricante de superficie celular	120304 T225 flask	120304 Cytodex 1	120304 Hillex II	CNTO 2476 Cytodex 1	CNTO 2476 Hillex II
CD 10	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CD 13	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CD 31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD 34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD 44	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CD 45	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD 73	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CD 90	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CD 117	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CD 141	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PDGFr-a	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
HLA-ABC	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
HLA-DRDPDQ	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC 120304 criopreservada a duplicación de la población 12,8 y se expandió sobre microportadores Cytodex[®] 1 y HILLEX[®] II a duplicación de la población 28,6 y 28,7, respectivamente. Las horas por duplicación de la población fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable y estuvieron de acuerdo con la cinética de crecimiento en matraces T. Pudo descongelarse la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 criopreservada a duplicación de la población 22,6 y se expandió sobre microportadores Cytodex[®] 1 y HILLEX[®] II a duplicación de la población 33,2 y 31,0, respectivamente. Las horas por duplicación de la población fueron coherentes de pase a pase, que indica crecimiento logarítmico estable y también estuvieron de acuerdo con la cinética de crecimiento en matraces T. Los análisis estadísticos por ANOVA unilateral de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestran diferencia significativa en la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas ($p=0,988$). También permaneció coherente la expresión de proteínas de la superficie celular en la recogida final para todas las condiciones probadas. Estos datos demostraron la capacidad de hUTC para expandirse a aproximadamente 30 duplicaciones de la población sobre microportadores de un modo coherente estable que mantiene el fenotipo de la proteína de la superficie celular. Este sistema modelo puede aumentarse de escala para producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

45 EJEMPLO 12

Expansión de hUTC sobre microportadores Cytodex[®] 1 en un biorreactor de 3 l

El objetivo de este estudio era expandir células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) adherentes a microportadores Cytodex[®] 1 en un biorreactor a escala de laboratorio durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre Cytodex[®] 1 durante múltiples duplicaciones de la población en un biorreactor a escala de laboratorio servirá de sistema de bioprocesamiento modelo para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se usó la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 expandida a aproximadamente el 70 % de confluencia sobre microportadores Cytodex[®] 1 en un matraz con agitación de 500 ml para inocular un biorreactor de 3 l que contenían medio adicional y microportadores Cytodex[®] 1. Las células se cultivaron en el biorreactor durante seis días tomándose una alícuota en el día 3 para calcular una cifra de células a mitad de proceso.

Las hUTC lograron aproximadamente tres duplicaciones de la población en seis días. El pH del sistema se mantuvo satisfactoriamente a 7,0 por una cubierta de aire con CO₂ y sin burbujeo. El DO del sistema se mantuvo satisfactoriamente al 40 % por cubierta de aire con oxígeno y sin burbujeo. La proliferación del cultivo del día 0 al día 3 fue indicativa de crecimiento logarítmico estable. La reducida tasa de proliferación observada del día 4 a 6 fue lo más probablemente debida a un agotamiento de nutrientes (es decir, glucosa) en el medio por el aumento de la masa de células.

Estos datos demuestran la capacidad de hUTC para expandirse sobre Cytodex[®] 1 en un biorreactor a escala de

laboratorio. Este sistema de bioprocesamiento modelo puede aumentarse de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

El objetivo de este estudio era expandir células derivadas de tejido umbilical humanas (hUTC) adherentes a microportadores Cytodex[®] 1 en un biorreactor a escala de laboratorio durante múltiples duplicaciones de la población. La capacidad para expandir hUTC sobre Cytodex[®] 1 durante múltiples duplicaciones de la población en un biorreactor a escala de laboratorio servirá de sistema de bioprocesamiento modelo para aumentar de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones en terapia celular. Se usó la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 expandida a aproximadamente el 70 % de confluencia sobre microportadores Cytodex[®] 1 en un matraz con agitación de 500 ml para inocular un biorreactor de 3 l que contenía medio adicional y microportadores Cytodex[®] 1. Las células se cultivaron en el biorreactor durante seis días tomándose una alícuota en el día 3 para calcular una cifra de células a mitad de proceso.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células. Se usó la cepa CNTO 2476 de células de tejido del cordón umbilical humanas (hUTC) expandidas criopreservadas lote 25126078 PD 7.

Medios de crecimiento. Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-baja glucosa sin rojo de fenol (Gibco-Grand Island, NY), 15 % de suero bovino fetal (SBF) (HyClone- Logan UT), GlutaMAX[®] 4,00 mM (Gibco- Grand Island, NY)

Reactivos de recogida. 1x TrypLE Select (Gibco- Grand Island, NY), 10x TrypLE Select (Gibco- Grand Island, NY),

Microportadores. Se hidrataron microportadores Cytodex[®] 1 (GE Health Sciences- Piscataway, NJ) en PBS durante al menos 3 horas y se esterizaron en autoclave. Los microportadores Cytodex[®] 1 se usaron a una concentración de 3 g/l.

Biorreactor. Biorreactor con camisa de 3 l (Applikon, Inc., Foster City, CA) con un controlador B-DCU (Sartorius BBI, Bethlehem, PA)

Inoculación en biorreactor. Se transfirieron asépticamente 1,5 g de microportadores con células unidas a aproximadamente el 70 % de confluencia producidas de un matraz con agitación de 500 ml a un biorreactor de 3 l que contenía 7,5 g de Cytodex[®] 1 y aproximadamente 2 l de medio de crecimiento. A continuación se añadió medio de crecimiento adicional para llevar el volumen final a 3 l.

Parámetros del biorreactor. El agitador del biorreactor fue 65 rpm. El punto de ajuste del pH fue 7,0 y se controló con adición de CO₂. Se dejó que el oxígeno disuelto (DO) descendiera del 100 % al 40 % de punto de ajuste de DO y se mantuvo por adición de oxígeno. La cubierta de aire se fijó a 25-150 cm³ y no se usó burbujeo.

Recogida de células adherentes a microportadores Cytodex[®] 1. Se apagó el agitador del biorreactor y se dejó que los microportadores con células adherentes sedimentaran por gravedad. El sobrenadante del medio se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. Se bombearon 3 l de PBS en el biorreactor y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante de PBS se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. Se bombearon 3 l de DMEM-baja glucosa en el biorreactor. El agitador del biorreactor se ajustó durante 30 minutos a 65 rpm. A continuación se apagó el agitador y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante de DMEM-baja glucosa se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. A continuación se bombearon 3 l de PBS en el biorreactor. El agitador del biorreactor se ajustó durante 20 minutos a 65 rpm. A continuación se apagó el agitador y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante de PBS se bombeó fuera a través de un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados. A continuación se bombearon 1 l de 1x TrypLE[™] Select y 50 ml de 10x TrypLE[™] Select en el biorreactor. El agitador del biorreactor se ajustó durante 20 minutos a 65 rpm. Se apagó el agitador y se dejó que los microportadores sedimentaran por gravedad. El sobrenadante que contenía células se bombeó fuera mediante un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados en un recipiente de transferencia precargado con una pequeña cantidad de SBF. A continuación se bombearon 1,5 l de PBS en el biorreactor para resuspender cualquier célula restante. El sobrenadante que contenía células se bombeó fuera mediante un tubo de inmersión posicionado por encima de los microportadores sedimentados en un recipiente de transferencia precargado con SBF. Todo el sobrenadante que contenía células se transfirió a múltiples tubos cónicos de 500 ml. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 300 fcr, se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en medio de crecimiento y se obtuvo una alícuota para el recuento de células.

Cifras de células en cultivo - Ensayo de liberación de núcleos. Se obtuvo una alícuota de suspensión de microportadores homogénea del recipiente de matraz con agitación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante por aspiración. Los microportadores se

5 lavaron una vez con 10 ml de PBS, se dejó que los microportadores se separaran por gravedad y se extrajo el sobrenadante de PBS por aspiración. Los microportadores se incubaron durante una hora a 37 °C en disolución de liberación de núcleos (ácido cítrico 0,1 M (Sigma- St. Louis, MO) que contenía 0,1 % en peso/volumen de cristal violeta (Sigma- St. Louis, MO). Después de la incubación se añadió una alícuota de 100 µl de la disolución de liberación de núcleos que contenía microportadores a 100 µl de PBS. A continuación se cargó una alícuota de 10 µl de esta disolución en un hemocitómetro y se contaron los núcleos liberados.

RESULTADOS

10 **Tabla 52. Cultivo continuo de la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 sobre microportadores Cytodex® 1.**

CNTO 2476 en cytodex 1						
alícuota	Sembrado	Rendimiento	Duplicación	Duplicación total	Tiempo (Días)	Horas /duplicación
inoculación		8.99E+07				
Media ejecución muestra	8.99E+07	5.38E+08	2.58	2.58	3.00	27.89
sembrado	5.38E+08	6.73E+08	0.32	2.90	3.00	223.21

25 Se usaron la cepa aislada de hUTC CNTO 2476 adherente al 70 % de confluencia a 1,5 g de Cytodex® 1 para inocular un biorreactor de 3 l. El pH del sistema se mantuvo satisfactoriamente a 7,0 por una cubierta de aire con CO₂ y sin burbujeo. El DO del sistema se mantuvo satisfactoriamente al 40 % por cubierta de aire con oxígeno y sin burbujeo. Las hUTC lograron aproximadamente tres duplicaciones de la población en seis días. La proliferación del cultivo del día 0 al día 3 fue indicativa de crecimiento logarítmico estable. La reducida tasa de proliferación observada desde el día 4 a 6 fue lo más probablemente debida a un agotamiento de nutrientes (es decir, glucosa) en el medio por el aumento de la masa de células.

35 Estos datos demuestran la capacidad de hUTC para expandirse sobre Cytodex® 1 en un biorreactor a escala de laboratorio. Este sistema de bioprocesamiento modelo puede aumentarse de escala para la producción a gran escala de hUTC para aplicación en terapia celular.

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje que comprende:

- 5 proporcionar al menos una célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje aislable de tejido del cordón umbilical sustancialmente libre de sangre;
proporcionar un medio de crecimiento celular para cultivar la célula derivada de tejido umbilical;
proporcionar al menos un microportador para la unión de la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el microportador es tanto: (i) un microportador sin proteína que tiene una superficie positivamente cargada; como (ii) un microportador recubierto con colágeno; y
10 poner en contacto la célula dependiente del anclaje con el microportador en presencia del medio de crecimiento en condiciones que permitan la unión y el crecimiento de la célula, en el que las condiciones que permiten la unión y el crecimiento de la célula al inicio del cultivo en microportador usan agitación constante, cultivando así la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje, en el que el fenotipo de las células es CD10+, CD13+, CD31-, CD34-, CD44+, CD45-, CD73+, CD90+, CD117-, CD141-, PDGFR- α +, HLA-A+, HLA-B+, HLA-C+, HLA-DR-, HLA-DP- y HLA-DQ- y son fenotípicamente las mismas que las células cultivadas en cultivos estáticos para cada uno de los marcadores.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microportador contiene un agente bioactivo que regula el crecimiento o función de la célula.
- 20 3. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que comprende además un segundo tipo de célula co-cultivada con dichas células derivadas de tejido umbilical dependientes del anclaje.
- 25 4. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el microportador comprende un material seleccionado del grupo que consiste en colágeno, dextrano, celulosa, vidrio, cerámica, metal, poliestireno, poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico), poli-D,L-lactida-co-glicolida e hialuronato de sodio.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el microportador está recubierto con poli(monoestearoilglicérido-co-ácido succínico), poli-D,L-lactida-co-glicolida, hialuronato de sodio, fibronectina, laminina, elastina, lisina, n-isopropilacrilamida, vitronectina o colágeno.
- 35 6. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el microportador comprende una superficie texturizada o recubierta con plasma.
- 40 7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el microportador posee una microcorriente o es paramagnético.
- 45 8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el microportador es un microportador poroso.
- 9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente que produce al menos cinco duplicaciones de la población durante veinte días.
- 10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el tiempo de duplicación para la población es inferior a 100 horas.
- 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el tiempo de duplicación para la población es inferior a 70 horas.
- 50 12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que condiciones que permiten la unión y crecimiento de la célula derivada de tejido umbilical dependiente del anclaje comprenden una temperatura de aproximadamente 37 °C.
- 55 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que las condiciones comprenden además un matraz con agitación o biorreactor.
- 60 14. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el medio de crecimiento celular comprende una concentración en suero del 7 % al 15 %.

65