

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 528**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2007** **E 13164303 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2626417**

54 Título: **Métodos de expansión de células y usos de células y de medios de acondicionamiento producidos por los mismos para terapia**

30 Prioridad:

23.03.2006 US 784769 P

26.09.2006 US 847088 P

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

29.10.2015

73 Titular/es:

PLURISTEM LTD. (100.0%)

Matam Building 20

31905 Haifa, IL

72 Inventor/es:

MERETZKI, SHAI;

ABERMAN, ZAMI y

BURGER, ORA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 549 528 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de expansión de células y usos de células y de medios de acondicionamiento producidos por los mismos para terapia

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

5 La presente invención se refiere a métodos de expansión de células, poblaciones de células producidas por ellos y usos de los mismos. Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para la expansión de las células adherentes a partir de placenta o de tejido adiposo (a lo largo de toda la PCT) y usos terapéuticos de las mismas, tales como para trasplante de células madre hematopoyéticas.

10 En el ámbito médico en desarrollo existe la creciente necesidad de grandes cantidades de células madre adultas destinadas al injerto de células e ingeniería de tejidos. Además, la terapia con células madre adultas se está desarrollando continuamente para el tratamiento y la curación de enfermedades o condiciones diversas, tales como trastornos hematopoyéticos, enfermedades cardíacas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, quemaduras, distrofia muscular, trastornos autoinmunitarios, diabetes y artritis.

15 Las células madre hematopoyéticas (HSCs: Hematopoietic Stem Cells) son células precursoras, que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas, tanto del linaje mieloide como del linfóide. El injerto y la iniciación de la hematopoyesis por HSCs trasplantadas dependen de la capacidad de esas células para migrar y proliferar dentro de la BM del receptor.

20 Está ampliamente aceptado que las células madre están íntimamente asociadas in vivo con nichos discretos en la médula ósea, que proporcionan señales moleculares que median colectivamente su diferenciación y auto-renovación, a través de contactos célula-célula o interacciones de corto alcance. Estos nichos son parte del "microentorno inductivo hematopoyético" (HIM), compuesto de células de la médula ósea, es decir macrófagos, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales. Las células de la médula ósea mantienen la integridad funcional del HIM proporcionando proteínas de la matriz extra celular (ECM: Extra Celular Matrix) y componentes de la membrana basal que facilitan el contacto célula-célula. También proporcionan varias citocinas solubles o residentes necesarias
25 para la diferenciación y la proliferación controlada de células hematopoyéticas.

Se requiere que las interacciones entre las HSCs y el estroma preserven la viabilidad de las HSCs y eviten su diferenciación. Después del trasplante de HSCs, las HSCs trasplantadas deben migrar al microentorno de la médula ósea (BM: Bone Marrow) y alojarse en los nichos apropiados antes de proliferar y diferenciarse. Durante el proceso migración, las HSCs trasplantadas salen del torrente sanguíneo y transmigran siguiendo un gradiente de quimiocinas través de la barrera de células endoteliales de la BM para llegar a los nichos de destino. Las HSCs del donante debe entonces dirigirse a los nichos hematopoyéticos en donde encuentran un microentorno más favorable para la división de HSCs, y en donde puede ser establecido un continuo contacto físico y químico entre las HSCs y las células mesenquimales, el ECM y los factores de crecimiento segregados. Todos estos procesos implican una serie compleja de moléculas tales como citocinas, quimiocinas, hormonas, esteroides, proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas de interacción célula a célula, proteínas de adhesión, y proteínas matriz.
30
35

El número total de células injertadas en los nichos de la BM dedicados sustenta el éxito del trasplante de HSCs. Para lograr el injerto, las HSCs de donantes que son trasplantadas en la circulación sanguínea deben dirigirse a la médula del receptor donde generan focos de hematopoyesis funcional. Se concluye que el número de estos focos es el producto de HSCs totales transfundidas multiplicado por su eficiencia de injerto.
40

Uno de los mayores problemas implicados con el trasplante de HSCs es la baja tasa de supervivencia de estas células en el sistema aceptor. Está bien documentado que las HSCs trasplantadas por vía intravenosa son eliminadas de la circulación y visualizadas en la BM al cabo de unos minutos después de su transfusión. De tres a cinco horas después del trasplante de HSCs, no se detectan células del donante en la sangre periférica de los receptores [Askenasy et al. 2002 Transplanted hematopoietic cells seed in recipient bone marrow in vivo, Stem Cells 20: 301 - 10]. La gran mayoría de las células trasplantadas se destruyen poco después de ser transfundidas. En consecuencia, la colonización de la médula del receptor es de baja eficiencia y sólo 1 - 5% de las células transfundidas son detectadas en la BM del receptor 2 - 3 días después del trasplante [Kerre et al 2001 2001 Both CD34+ 38+ and CD34+ 38- cells home specifically to the bone marrow of NOD/LtSz scid/scid mice but show different kinetics in expansion. J. Immunol. 167: 3692 - 8; Jetmore et al 2.002 2.002 Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. Blood. 99: 1585 - 93].
45
50

Las células estromales mesenquimales (MSCs: Mesenchymal Stromal Cells) son una población heterogénea de células capaces de diferenciarse en distintos tipos de células mesenquimales maduras. La diferenciación de estas células en células endoteliales reticulares, fibroblastos, adipocitos, y células precursoras osteogénicas depende de la influencia de varios factores bioactivos.
55

El uso de MSCs para el apoyo del injerto de HSC es conocido en la técnica. Varias publicaciones han demostrado eficiencias de injerto más altas de HSC cuando se co-trasplantan con células madre mesenquimales [Gurevitch et al. 1999 1999 Transplantation of allogeneic or xerogeneic bone marrow within the donor stromal microenvironment. Transplantation 68: 1362 - 8; Fan et al. 2001 2001 Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. [Stem Cells. 19: 144 - 50]. También se demostró que el co-trasplante de células madre mesenquimales humanas en un modelo de injerto humano-ovino tuvo como resultado la mejora del injerto a largo plazo de BM quimérica de HSCs humanas en los animales [Almeida - Porada et al. 2000]. El co-trasplante de progenitores de células estromales humanas en ovejas fetales preinmunes tuvo por resultado la aparición temprana de células de donante humano en la circulación y eleva los niveles de células en la médula ósea en momentos posteriores después del trasplante [Blood. 95: 3620 - 7]. Se encontró que la inyección simultánea de HSC y células madre mesenquimales aceleraba la hematopoiesis [Zhang et al. 2004. Stem Cells 22: 1256 - 62]. Recientemente, estos hallazgos se extendieron a un modelo animal más próximo, el mono Rhesus. Cuando se co-trasplantaron células madre HSCs y mesenquimales haplo-idénticas, se demostró un injerto de HSC facilitado [Liu et al. 2005 Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 26: 385 - 8]. También se publicó recientemente el uso de células madre mesenquimales para promover el injerto de HSC en sujetos humanos [Koc O. N., J. Clin. Oncol. 2000; 18: 307 - 316; Lazarus H. M., Biol Blood Marrow Transplant. 2005 de mayo; 11 (5): 389 - 98].

Aparentemente, la contribución de las MSCs al injerto hematopoyético reside en la producción de citocinas de apoyo de HSCs que ayudan mediando y equilibrando la migración, auto-renovación y potenciales de compromiso de las HSCs trasplantadas, en la reconstrucción del microentorno hematopoyético dañado que se necesita para la migración y la proliferación de las HSCs y en la inhibición de las células T derivadas del donante, que pueden causar la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD: Graft versus Host Disease), [Charbord P., y Moore, K., Ann. N. Y. Acad. Sci 1044: 159 - 167 (2005); patentes de EE.UU. Nos. 6.010.696; 6.555.374]. Por ejemplo, en un estudio de Maitra, [Maitra B, et al, Bone Marrow Transplant 33 (6): 597 - 604. (2004)], se encontró que las células madre mesenquimales humanas apoyan a las células madre hematopoyéticas del donante no relacionado y suprimen la activación de las células T en el modelo de ratones NOD-SCID, lo que muestra que las MSCs derivadas de médula ósea humana no relacionada pueden mejorar el resultado del trasplante alogénico.

Un importante obstáculo en el uso de MSCs es la dificultad de aislar grandes cantidades de poblaciones de estas células que se producen de forma natural, aislamiento que es técnicamente difícil y costoso, debido en parte a la cantidad limitada de células. La fuente más obvia de MSCs es la médula ósea, pero el importante malestar implicado en la obtención de los aspirados de médula ósea y el riesgo de la biopsia sirven como inconvenientes de estos métodos. La creencia generalizada de que el embrión y el feto humanos constituyen vida independiente hace que el embrión humano sea una fuente problemática de células madre, sumando un aspecto religioso y ético a las dificultades logísticas ya existentes.

Se ha intentado recientemente encontrar fuentes alternativas para recolectar células madre. Tales fuentes alternativas son por ejemplo tejido adiposo, folículos pilosos, testículos, mucosa olfativa humana, saco vitelino embrionario, placenta, piel de adolescente y sangre (por ejemplo, sangre del cordón umbilical e incluso sangre menstrual). Sin embargo, la recolección de células madre de las fuentes alternativas en cantidades adecuadas con fines terapéuticos y de investigación es aún limitada y generalmente laboriosa, implicando, por ejemplo, la recolección de células o tejidos de un sujeto donante o paciente, el cultivo y/o la propagación de células in vitro, disección, etc.

La placenta está considerada una de las fuentes de células madre más accesibles que no está relacionada con ninguna molestia ni ninguna restricción ética. Se encontró que las MSCs derivadas de placenta tienen propiedades similares a las de MSC derivadas de la BM. Son adherentes al material plástico, expresan marcadores de membrana CD105, CD73 y CD90, y carecen de la expresión de CD45, CD34, CD14, CD19 y moléculas de superficie HLA-DR. Sin embargo, a diferencia de las MSCs derivadas de la BM, las MSCs derivadas de placenta (PD) tratadas con interferón γ regularon por exceso HLA-DR de forma mínima. Además, las células PD-MSCs manifiestan propiedades inmunosupresoras que se potencian en presencia de interferón γ . (Chang C. J., Yen M. L., Chen Y. C., Chien C. C., Huang H. I., Bai C. H., Yen B. L. Placenta derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon γ . Stem Cells 2006 nov; 24 (11): 2466 - 77.

Además de marcadores MSC las PD-MSC muestran marcadores de superficie ESC únicos de SSEA-4, TRA-1-61, y TRA-1-80, que sugieren que éstas pueden ser células muy primitivas (Yen. B.L., Huang H. I., Chien C. C., Jui H. Y., Ko B. S., Yao M., Shun C. T., Yen M. L., Lee M. C., Chen Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells 2005; 23 (1): 3 - 9). Además, las PD-MSCs (origen fetal), pero no MSC derivadas de BM, son positivas para el antígeno G leucocitario humano intracelular (HLA). ? (Chang C. J., Yen M. L., Chen Y. C., Chien C.C., Huang H. I., Bai C. H., Placenta-derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon gamma. Stem Cells 2006 nov; 24 (11): 2466 - 77).

Hay estudios que demuestran que el potencial de expansión de PD-MSCs era significativamente más alto que el de las MSCs derivadas de BM adultas (Yen B. L., Huang H. I., Chien C. C., Jui H. Y., Ko B. S., Yao M., Shun C.T., Yen M.L., Lee M. C., Chen Y. C. Isolation of multipotent cells from Human Term Placenta. Stem Cells 2005; 23 (1): 3 - 9); M. J. S. De Groot-Swings, Frans H. J. Claas, Willem E. Fibbe y Humphrey H. H. Pieterella S. en 't Anker, Sicco A.

Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Godelieve. Placenta Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal and Maternal Origin from Human. *Stem Cells*, 2004; 22; 1338 - 1345). Además las células adherentes derivadas de placenta pueden diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Al igual que las MSCs derivadas de BM, se encontró que las MSCs derivadas de placenta suprimen la proliferación de linfocitos de la sangre de cordón umbilical (UCB) lo que sugiere que el trasplante combinado de HSCs y MSCs derivadas de placenta (PD) puede reducir el la enfermedad potencial de injerto contra huésped (GvHD) en los receptores [Li C.D., et al., *Cell Res.* Jul; 15 (7): 539 - 47 (2005)], y puede potenciar el apoyo hematopoyético [Zhang Yi et al, *Chinese Medical Journal* 117 (6): 882 - 887 (2004)]. El uso de la placenta como fuente de células epiteliales amnióticas se enseña por ejemplo en el documento WO 00/73421, pero la obtención de estas células es aún muy laboriosa y el rendimiento de MSCs es muy bajo.

Otra forma de resolver el problema de la cantidad limitada de MSCs es la expansión *ex vivo* de estas células usando diferentes condiciones de cultivo [por ejemplo, patentes de EE.UU. Nos. 6.326.198; 6.030.836; 6.555.374; 6.335.195; 6.338.942]. Sin embargo, el inconveniente de tales métodos sigue estando en los largos procedimientos de selección específica y de aislamiento que requieren, lo que hace que estos métodos sean costosos y fastidiosos.

Se encontró que el cultivo de células tridimensional (3D) era en varios estudios más eficaz en rendimiento [Ma T, et al., *Biotechnology Progress*. *Biotechnol Prog* 15: 715 - 24 (1999); Yubing Xie, *Tissue Engineering* 7 (5): 585 - 598 (2001)]. El uso de procedimientos de cultivo 3D que imitan el entorno natural de las MSCs se basa en la siembra de estas células en un biorreactor de perfusión que contiene espumas poliactivas [Wendt, D. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 84: 205 - 214, (2003)] andamiajes porosos de poli (ácido L-láctico) (PLLA) tubulares en un biorreactor de flujo radial [Kitagawa et al, *Biotechnology and Bioengineering* 93 (5): 947 - 954 (2006)], y un biorreactor de flujo pistón para el crecimiento y la expansión de células madre hematopoyéticas (patente de EE. UU. n° 6.911.201).

Un marco tridimensional, que une células estromales, fue sugerido en la patente de EE. UU. n° 6.022.743, y la esponja de colágeno se sugirió como una matriz 3D en Hosseinkhani, H. et al., [*Tissue Engineering* 11 (9 - 10): 1476 - 88 (2005)]. Sin embargo, el uso de MSCs cultivadas en estas condiciones para soportar el injerto *in vivo* de las HSCs después del trasplante de HSCs nunca ha sido sugerido en ninguno de estos estudios. Además, se requirió una optimización de mucho tiempo de varias condiciones, por ejemplo las condiciones de perfusión, o diversas técnicas de aislamiento para los tipos específicos de células.

El uso de una placenta post-parto perfundida como un reactor 3D para el cultivo de MSCs fue sugerido en la patente de EE. UU. n° 7.045.148 y en la solicitud de patente de EE. UU. n° 20020123141, 20030032179 y 2005011871. Sin embargo, este procedimiento está limitado hasta 24 horas después de que la placenta es aislada e implica la perfusión, y por tanto no es posible el crecimiento en masa de las células y su mantenimiento durante periodos de tiempo prolongados. Lazarus (*Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11 (2005), pp 389 - 398) describe que es posible el cotrasplante de MSCs hermanas HLA-idénticas con un trasplante de HSC hermana HLA-idéntica.

Li et al. (*Cell Research* 15 (2005) pp. 539 - 547), Puissant et al. (*British Journal of Haematology*) 129 (2005), pp. 118 - 119) y Yanez et al. (*Blood*, 106 (2005), p. 866A) describen todos ellos la actividad inmunomoduladora de MSCs procedentes de placenta o de tejido adiposo.

Así pues hay una necesidad ampliamente reconocida, y sería muy ventajoso tener nuevos métodos de expansión de células y usos de células y el medio acondicionado producido de este modo para la terapia y que carezcan de las limitaciones anteriores.

RESUMEN DE LA INVENCION.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la expansión de células, comprendiendo el método el cultivo de células adherentes procedentes de placenta o tejido adiposo bajo condiciones de cultivo tridimensionales, que apoyan la expansión celular.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir un medio acondicionado, comprendiendo el método: cultivar células adherentes procedentes de una placenta o un tejido adiposo en condiciones de cultivo tridimensionales que permiten la expansión celular; y recolectar un medio acondicionado de las células adherentes expandidas, produciendo así el medio acondicionado.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una población de células generadas de acuerdo con el método anterior.

De acuerdo con otro aspecto más, se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de placenta o tejido adiposo, en el que las células adherentes segregan un nivel de al menos un factor seleccionado entre el grupo que consiste en SCF, IL-6 y Flt-3 más alto que el segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de placenta o tejido adiposo, en el que las células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en la familia de la histona H2A (H2AF), aldehído deshidrogenasa

X (ALDH X), factor de alargamiento de la traducción eucariótica 2 (EEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión de EF-hand calcio (RCN2) y calponina 1 del músculo liso básica (CNN 1), más alto que el expresado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional más, se proporciona una población aislada de células que comprenden células adherentes de placenta o tejido adiposo, en el que las células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 isoforma a (Papss2) y proteína ribosomal L7a (rpL7a), más bajo que el expresado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 10 De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de placenta o tejido adiposo, en el que las células adherentes se caracterizan por una actividad inmunosupresora más alta que la de las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención que se describe más adelante la actividad inmunosupresora comprende reducción en la proliferación de células T.
De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la población de células generada de acuerdo con el método anterior.
De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, el medio acondicionado producido de acuerdo con el método anterior.
- 20 De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la población de células aislada de acuerdo con lo anterior.
De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para tratar una condición que puede aprovecharse de un trasplante de células estromales en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido elegido entre el grupo que consiste en placenta y tejido adiposo obtenido de un cultivo tridimensional, tratando así la condición que puede beneficiarse de trasplante de células madre en el sujeto.
- 25 De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona un método para tratar una condición que puede beneficiarse de un trasplante de células estromales en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un medio acondicionado de células adherentes derivadas de un tejido elegido entre el grupo que consiste en placenta y tejido adiposo, tratando así la condición que puede beneficiarse del trasplante de células madre en el sujeto.
- 30 De acuerdo con otro aspecto adicional, se proporciona un método para reducir una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la población aislada de células de las reivindicaciones 3, 4, 5, 6 o 7, para reducir la respuesta inmunitaria en el sujeto.
- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el sujeto se trata con terapia celular.
De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el método comprende además administrar células madre.
- 40 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células madre comprenden células madre hematopoyéticas.
De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células se administran al mismo tiempo que el medio acondicionado o células adherentes.
- 45 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células se administran después de la administración del medio acondicionado o de las células adherentes.
De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes se obtienen de un cultivo tridimensional.
De acuerdo con otras características las células adherentes se obtienen a partir de un cultivo bidimensional.
- 50 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la condición que se ha de tratar con (el medio acondicionado de) las células estromales adherentes se elige entre el grupo que consiste en trastornos autoinmunitarios, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), encefalitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de

Sjorgen, miastenia gravis (MG), síndrome de Guillain-Barré (GBS), tiroiditis de Hashimoto (HT), enfermedad de Grave, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) y enfermedad intestinal inflamatoria. Con las células estromales adherentes, también puede ser tratada la hemorragia y la anemia.

5 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas el cultivo tridimensional comprende un biorreactor 3D.

De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas el biorreactor se elige entre el grupo que consiste en un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor continuo de tanque agitado y un biorreactor de lecho estacionario.

10 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas, el cultivo de las células se efectúa bajo un flujo continuo de un medio de cultivo.

15 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el cultivo tridimensional comprende un material adherente elegido entre el grupo que consiste en un poliéster, un polialquileño, un polifluorocloroetileno, un poli(cloruro de vinilo), un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de matriz extracelular, un colágeno, un poli (ácido L láctico) y una fibra de metal inerte.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza durante al menos 3 días.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza durante al menos 3 días.

20 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza hasta que las células adherentes alcanzan al menos el 60% de confluencia.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas la condición puede beneficiarse de la facilitación del injerto de células madre hematopoyéticas.

25 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador positivo elegido entre el grupo que consiste en CD73, CD90, CD29 y CD105.

De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador negativo elegido entre el grupo que consiste en CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79.

30 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes segregan un nivel de al menos un factor elegido entre el grupo que consiste en SCF, Flt-3 e IL-6 más alto que el segregado por las células adherentes a partir de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

35 De acuerdo con otras características más en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína elegida entre el grupo que consiste en la familia de histona H2A (H2AF), aldehído deshidrogenasa X (ALDH X), factor de alargamiento de la traducción eucariótica 2 (E2F2), reticulocalbina 3, dominio de unión de EF-hand calcio (RCN2) y calponin 1 básica del músculo liso (CNN1) más alto que el segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

40 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína elegida entre el grupo que consiste en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, isoforma a de 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 (Paps2) y proteína ribosomal L7a (rpL7a) menor que el segregado por las células adherentes a partir de placenta o tejido adiposo cultivadas en un cultivo 2D.

45 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas las células adherentes o el medio se caracterizan por una actividad inmunosupresora más alta que la de las células adherentes de placenta o tejido adiposo cultivadas en un cultivo 2D.

De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas la actividad inmunosupresora comprende la reducción en la proliferación de células T.

De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas las células comprenden células que tienen un fenotipo de células madre estromales.

50 De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas el fenotipo de células madre estromales comprende la supresión de la actividad de células T.

De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas el fenotipo de células madre estromales comprende actividad de soporte de las células madre hematopoyéticas.

De acuerdo con otras características en las realizaciones preferidas descritas el uso de la población de células descrita anteriormente es para la elaboración de un medicamento identificado para trasplante.

- 5 La presente invención aborda con éxito los inconvenientes de las configuraciones conocidas actualmente proporcionando nuevos métodos de expansión celular y usos de células y medio acondicionado producidos de este modo para terapia.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente texto tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 10 Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente texto en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, decidirá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

- 15 La invención se describe en el presente texto, solamente a título de ejemplo, con referencia a los dibujos anexos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que las particularidades mostradas son a título de ejemplo y solamente para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácil de entender de los principios y aspectos conceptuales de la invención. Con respecto a esto, no se hace intento alguno de mostrar
20 detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada con los dibujos para los expertos en la técnica cómo pueden ser puestas en práctica las diversas formas de ejecución de la invención.

En los dibujos:

- 25 Las Figuras 1a-g representan el microentorno similar a hueso creado en el sistema de biorreactor que contiene portadores 3-D. Las Figuras 1a-b son micrografías electrónicas que representan la comparación de hueso natural (Figura 1a) y la estructura del portador PluriX™ 3D a los 7 días después de la siembra de las células estromales adherentes (3D-ASC), imitando el microentorno del hueso (Figura 1b). Las Figuras 1c-f son micrografías electrónicas que representan la matriz PluriX™ 3D sembrada con 3D-ASC, producida por la médula ósea, a los 20 días (Figuras 1e-d, aumentos x 150 y 250, respectivamente) y a los 40 días (Figuras 1ef, aumentos x 350 y 500, respectivamente)
30 después de la siembra. La Figura 1g es un diagrama del biorreactor de flujo pistón PluriX 3D con partes separadas definidas por los números: depósito de medio de cultivo (1), suministro de mezcla de gas (2), filtro (3), punto de inyección (4), columna en la que ponen los portadores 3D (5), monitor de flujo (6), válvula de flujo (6a), recipiente de separación (7), analizadores del crecimiento celular (8), bomba peristáltica (9), punto de muestreo (10), electrodo de medida del O₂ disuelto (11), electrodo de medida del pH (12), sistema de control (13), medio de cultivo fresco (14),
35 medio de cultivo usado (15).

- La Figura 2 es un gráfico que representa diferentes lotes de producción de células estromales adherentes (3D-ASC, lotes 5 - 8) procedentes de placenta, cultivadas en condiciones de crecimiento 3D dentro de los sistemas de biorreactor. Las ASCs (2×10^6) fueron sembradas en el biorreactor a una densidad de 10000 - 15000 células/portador. Después de un cultivo de 12 días las 3D-ASCs alcanzaron una densidad entre 150.000 - 250.000 células/portador o $22,5$ a $37,5 \times 10^6$ en un biorreactor que contiene 150 portadores.
40

- Las Figuras 3a-b son gráficos de barras que representan la diferencia en los niveles de expresión de los marcadores de membrana expresados en 3D-ASC derivadas de placenta (violeta oscuro) en comparación con marcadores de membrana en células de placenta cultivadas en condiciones de cultivo 2D convencionales (violeta claro). Las células adherentes se cultivaron durante 4 - 6 semanas en frascos (2D) o durante 2 - 3 semanas en el sistema de biorreactor, en soportes de poliestireno (3D). Después de la recolección de los matraces o de los portadores, las células se incubaron y se unieron a un panel de anticuerpos monoclonales (MAb), que reconocen marcadores de membrana característicos de las MSCs (Figura 3 a), o células hematopoyéticas (Figura 3b). Obsérvese la expresión significativamente mayor de marcadores de membrana de MSC en células cultivadas 2D como se muestra para los marcadores de membrana CD90, CD105, CD73 y CD29, en comparación con marcadores de membrana MSC expresados en células adherentes cultivadas 3D, especialmente CD105 que mostró 56% de expresión en células cultivadas 3D frente al 87% en las células cultivadas 2D (Figura 3a). Las ASCs de cultivos 2D y 3D no expresaron ningún marcador de membrana hematopoyético (Figura 3 b).
45
50

- Las Figuras 4a-d son gráficos de barras que representan una comparación de los niveles de proteína en ASCs producidas a partir de placenta cultivadas bajo condiciones 2D y 3D o medios acondicionados de los mismos. Las Figuras 4a-c representan niveles de ligando Flt-3 (Figura 4a), IL-6 (Figura 4b) y SCF (Figura 4c) en pg/ml, normalizados para 1×10^6 células/ml, analizados mediante ELISA, en los medios acondicionados de ASCs cultivadas en 2D y 3D. Los resultados representan uno de tres experimentos independientes. La Figura 4d muestra los niveles de expresión de diferentes proteínas celulares, analizados por espectrometría de masas con muestras de
55

proteína marcadas con reactivos iTRAQ comparados entre ellos. Las muestras de proteína fueron tomadas de ASCs cultivadas en condiciones 2D (barras blancas) y 3D (barras grises). La figura representa uno de dos experimentos replicados. Obsérvese la diferencia en el nivel de expresión de algunas de las proteínas en las células y los medios acondicionados de las condiciones de cultivo 2D y 3D.

- 5 Las Figuras 5a-d son micrografías que representan la capacidad de diferenciación *in vitro* de 3D-ASC derivadas de placenta a osteoblastos. ASCs derivadas de placenta humana se cultivaron en un medio de inducción osteogénica (DMEM que contiene 10% de FCS, dexametasona 100 nM, ácido ascórbico 2-fosfato 0,05 mM, B-glicerofosfato 10 mM) durante un período de 3 semanas. Las Figuras 5a-b muestran células que expresan matriz calcificada, como se indica por la tinción con Rojo de Alizarina S. Las Figuras 5c-d muestran células testigo, que no fueron tratadas con medio de inducción osteogénica y mantenían un fenotipo similar a fibroblastos y que no muestran mineralización.

- 10 La Figura 6 es un gráfico que representa el porcentaje de células humanas CD45+ detectadas en la médula ósea (BM) de ratones NOD-SCID tratados con quimioterapia (inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de busulfán durante dos semanas consecutivas) 3,5 semanas después del trasplante. Las células CD34+ (100.000) purificadas a partir de células derivadas de sangre mononuclear del cordón, se trasplantaron solas (5 ratones, a) o se co-trasplantaron con $0,5 \times 10^6$ células adherentes derivadas de placenta cultivadas en condiciones 2D (2D-ASC, 2 ratones, b), o células adherentes derivadas de placenta cultivadas en condiciones 3D (3D-ASC), en el biorreactor PluriX™ (5 ratones, c). La BM fue recogida entonces del fémur y la tibia de ratones. Las células humanas en la BM se detectaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células humanas que expresan CD45 se determinó incubando las células con CD45 anti-humana - FITC. Obsérvese el mayor porcentaje de células humanas (hCD45+) en la médula ósea de ratones co-trasplantados con 2D-ASC (b), así como con 3D-ASC (c) en comparación con el porcentaje de células humanas en los ratones tratados con HSCs solamente (a). El injerto más elevado observado en los ratones tratados con células cultivadas 3D-ASC en comparación con los ratones tratados con células cultivadas 2D-ASC indica una mayor ventaja terapéutica única para ASCs cultivadas en 3D.

- 25 Las Figuras 7a-b son análisis FACS de las células CD45+ de injerto humano en ratones trasplantados con células CD34+ solamente (Figura 7a) en comparación con células CD34+ junto con ASCs de derivadas de tejido adiposo (Figura 7b). Obsérvese el porcentaje significativamente más alto de la población hematopoyética humana (hCD45+) (7a - 29%) en un ratón co-transplantado con ASCs derivadas de tejido adiposo en comparación con un ratón tratado con CD34+ humano solo (7b - 12%).

- 30 La Figura 8 es un gráfico de barras que representa una reacción de linfocitos mixtos llevada a cabo entre las células mononucleares humanas de sangre del cordón (CB), y cantidades iguales de células irradiadas (3000 Rad) de sangre de cordón (ICB), monocitos derivados de la sangre periférica humana (PBMC), ASCs placentarias cultivadas 2D o cultivadas 3D, o una combinación de PBMC y ASCs placentarias cultivadas 2D y 3D (PBMC+ 2D y PBMC + 3D). El tamaño de la población de células CB está representado por la absorción de ^3H -timidina (medida en CPM) que se midió durante las últimas 18 horas de cultivo. La elevación en la proliferación celular de CB estimulada indica una respuesta inmunitaria de un nivel más alto. Obsérvese el menor nivel de respuesta inmunitaria mostrado por las células incubadas con células adherentes, y, en particular, la reducción de respuesta inmunitaria de CB a PBMCs cuando se co-incubaron con células adherentes. En cada reacción se hicieron tres replicados.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS.

- 40 La presente invención es de nuevos métodos de expansión celular y usos de las células y el medio acondicionado producido por ellos, para la terapia relacionada con células madre, injerto de células madre y soporte de HSC.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden comprenderse mejor haciendo referencia a los dibujos y a las descripciones que los acompañan.

- 45 Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, se ha de entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la memoria descriptiva que sigue o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser llevada a la práctica de varias formas. También, se ha de entender que la fraseología y la terminología empleadas en el presente texto es con el propósito de descripción y no deben considerarse limitantes.

- 50 En el campo de la medicina en desarrollo, hay una necesidad creciente de células madre, y más específicamente de células madre estromales (también llamadas "células madre mesenquimales"), para fines clínicos y de investigación. Las MSCs se utilizan para soporte del trasplante de HSCs y el injerto y también para curar un número creciente de condiciones, por ejemplo, enfermedades cardíacas, deficiencias de la BM, enfermedades relacionadas neuronales, y condiciones que requieren trasplante de órganos o tejidos.

- 55 Los obstáculos en el uso de células madre residen en la dificultad técnica de aislar grandes cantidades de poblaciones que se producen de forma natural de células madre o progenitoras, debido a la cantidad limitada de estas células en la mayoría de los tejidos, la molestia y el riesgo involucrados en los procedimientos para la obtención de células madre, y la pérdida de células B de memoria y células madre hematopoyéticas que acompaña a los procedimientos de recolección actuales. La obtención de células del embrión humano añade un aspecto religioso y ético a las dificultades técnicas ya existentes.

Las fuentes alternativas de células madre derivadas de la médula ósea incluyen los tejidos adiposos y la placenta. Sin embargo, actualmente no hay métodos para la expansión eficiente de células madre a partir de dichos tejidos.

Al llevar a la práctica la presente invención, los presentes inventores han descubierto que las células adherentes procedentes de placenta o tejido adiposo se pueden propagar de manera eficiente en condiciones de cultivo 3D. Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que dichas células comprenden propiedades funcionales que son similares a las de las MSCs y por lo tanto estas células y el medio acondicionado producido de las mismas pueden utilizarse para fines terapéuticos tales como el trasplante, la regeneración de tejidos y en apoyo de HSCs *in vivo*.

Como se ilustra en el presente texto a continuación y en la sección de ejemplos que sigue, los presentes inventores pudieron expandir las células adherentes adiposas y derivadas de placenta que comprenden propiedades de las células madre estromales en marcos 3D. Las células expandidas en consecuencia se encontraron viables, después de la crio-conservación, como se pone de evidencia en ensayos de adherencia y repoblación (véase el Ejemplo 1). El análisis de citometría de flujo de células adherentes derivadas de placenta descubrió un patrón de expresión de marcador distinto (véanse las Figs. 3a-b). Lo que es más importante, las células adherentes adiposas y derivadas de placenta propagadas en marcos 2D o 3D pudieron apoyar el injerto de HSC (véase el Ejemplo 2), sustanciando el uso de las células de la presente invención, como células madre del estroma, en la clínica.

Así pues, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la expansión de células.

El método que comprende cultivar células adherentes procedentes de la placenta o de tejido adiposo bajo condiciones de cultivo tridimensionales (3D) que soportan la expansión celular.

Como se usa en el presente texto la expresión "que se expanden" y el término "expansión" se refieren al mantenimiento de las células sustancialmente sin diferenciar y finalmente el crecimiento celular, es decir, el aumento de una población de células (por ejemplo, al menos al doble) sin diferenciación que acompaña tal incremento.

Tal como se utiliza en el presente texto, los términos "mantener" y "mantenimiento" se refieren a la renovación de células sustancialmente no diferenciadas, es decir, población de células sustancialmente estacionarias sin diferenciación que acompaña a dicho carácter estacionario.

Como se usa en el presente texto la frase "células adherentes" se refiere a una población de células homogénea o heterogénea que son dependientes de anclaje, es decir, requieren la unión a una superficie para desarrollarse *in vitro*.

Como se usa en el presente texto la frase "tejido adiposo" se refiere a un tejido conjuntivo que comprende células grasas (adipocitos).

Tal como se utiliza en el presente texto, la expresión "tejido de la placenta" se refiere a cualquier porción del órgano femenino de un mamífero que reviste la pared uterina y durante el embarazo envuelve al feto, al que está unido por el cordón umbilical. Después del parto, la placenta es expulsada (y se conoce como placenta post- parto).

Como se usa en el presente texto la frase "condiciones de cultivo tridimensional" se refiere a la disposición de las células en condiciones que son compatibles con el crecimiento celular permitiendo al mismo tiempo que las células crezcan en más de una capa. Es bien entendido que el entorno *in situ* de una célula en un organismo vivo (o un tejido) como una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas por otras células. Se mantienen en una red compleja de fibras a nanoescala de la matriz extracelular que permite el establecimiento de diversos microentornos locales. Sus ligandos extracelulares median no sólo la unión a la membrana basal, sino también el acceso a una variedad de vasos vasculares y linfáticos. El oxígeno, las hormonas y los nutrientes son transportados a las células y los productos de desecho se eliminan. Las condiciones de cultivo tridimensional de la presente invención están diseñadas para imitaciones tales como el entorno como se ejemplifica más adelante con más detalle.

Así pues, las células adherentes de este aspecto de la presente invención son recuperadas de un tejido adiposo o placentario.

Las células placentarias se pueden obtener a partir de una placenta a término o una prematura. La placenta se recoge preferiblemente una vez que ha sido exsanguinada. La placenta se perfunde preferiblemente durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar las células residuales. El término "perfundir" o "perfusión" usado en el presente texto se refiere al acto de verter o pasar un fluido sobre un órgano o tejido o a través de los mismos. El tejido placentario puede ser de cualquier mamífero; lo más preferiblemente el tejido placentario es humano. Una fuente conveniente de tejido placentario es a partir de una placenta post-parto (por ejemplo, 1 a 6 horas), si bien la fuente de tejido o células placentarias o el método de aislamiento del tejido placentario no son críticos para la invención.

Se pueden obtener células adherentes derivadas de la placenta tanto de la parte de la placenta fetal (es decir, el amnios o partes internas de la placenta, véase el Ejemplo 1) como de la materna (es decir, decidua basal y decidua parietal). Las muestras de tejido se lavan en un tampón fisiológico (por ejemplo, solución salina tamponada con

fosfato (PBS) o tampón de Hank). Las suspensiones de una sola célula se hacen tratando el tejido con una enzima digestiva (véase más adelante) y/o desmenuzando y lavando las piezas de tejido a través de un filtro de nilón o mediante pipeteo suave (Falcon, Becton, Dickinson, San Jose, Calif.) con medio de lavado.

5 Las células adherentes derivadas del tejido adiposo se pueden aislar por diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, tales métodos se describen en la patente de EE. UU. n° 6.153.432. El tejido adiposo se puede derivar de sitios de tejido omental /visceral, mamario, gonadal, u otros sitios de tejido adiposo. Una fuente preferida de tejido adiposo es el adiposo omental. En los seres humanos, el tejido adiposo se aísla normalmente por liposucción.

10 Las células adherentes aisladas de tejido adiposo se pueden derivar por tratamiento del tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones efectivas de hialuronidasa o DNasa; y ácido etilendiaminetetraacético (EDTA); a temperaturas entre 25 y 50 °C, durante periodos de entre 10 minutos y 3 horas. Las células pueden luego ser pasadas a través de un filtro de malla de nilón o gasa de estopilla de entre 20 micras y 800 micras. Las células se someten después a centrifugación diferencial directamente en el medio de o sobre Ficoll o Percoll u otro gradiente de partículas. Las células se centrifugan a velocidades de entre 100 y 3.000 x g durante
15 periodos de entre 1 minuto y 1 hora a temperaturas de entre 4 y 50 °C (véase la patente de EE. UU. n° 7.078.230).

Además de las células adherentes derivadas de tejido de placenta o adiposo, la presente memoria descriptiva contempla también el uso de células adherentes procedentes de otras fuentes de células que se caracterizan por el fenotipo de células madre estromales (como se describirá con más detalle en este texto más adelante). Las fuentes de tejido a partir del cual pueden ser recuperadas las células adherentes incluyen, pero sin limitarse a ellas, sangre
20 del cordón umbilical, folículos pilosos [por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. 20060172304], testículos [por ejemplo, como se describe en Guan K., et al., Nature. 27 de abril de 2006; 440 (7088): 1199 - 203], mucosa olfativa humana [por ejemplo, como se describe en Marshall, T. C, et al., Histol. Histopathol. 2006 junio; 21 (6): 633-43], y líquido amniótico [Pieternella et al. (2004) Stem Cells 22: 1338 - 1345], todas las cuales son conocidas por incluir células madre mesenquimales. Las células adherentes procedentes de estas fuentes de
25 tejido pueden aislarse cultivando las células en una superficie adherente, aislando así las células adherentes de otras células en la población inicial.

Al margen del origen (por ejemplo, placenta o tejido adiposo), la recuperación de células se efectúa preferiblemente en condiciones estériles. Una vez que se obtienen las células aisladas, se les permite adherirse a un material adherente (por ejemplo, configurado como una superficie) para aislar de esta forma las células adherentes. Esto se
30 puede efectuar antes del cultivo en condiciones de cultivo 3D (véase el Ejemplo 1) o al mismo tiempo.

Como se usa en el presente texto "un material adherente" se refiere a un material sintético, uno de origen natural o una combinación de los mismos de un material no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) que tiene una estructura química (por ejemplo, grupos expuestos de superficie cargada), que pueden retener las células en una superficie.

35 Los ejemplos de materiales adherentes que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, un poliéster, un polialquileño, un polifluorocloroetileno, un poli (cloruro de vinilo), un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, condronectina, laminina), un colágeno, un poli ácido L láctico y una fibra de metal inerte.

40 Se pueden efectuar etapas adicionales de purificación o enriquecimiento para las células madre estromales utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica (tal como mediante FACS usando expresión de marcador de células madre estromales, tal como se describe con más detalle en el presente texto más adelante).

Los ejemplos no limitantes de medios de base útiles en el cultivo de acuerdo con la presente invención incluyen medio esencial mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (suero bovino libre de albúmina), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1,
45 DCCM2, RPMI 1640, Medio BGJ (con y sin Modificación de Fitton-Jackson), medio basal de Eagle (BME con la adición de base salina de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, Modificación Glasgow del Medio de Eagle (GMEM), medio de Leibovitz L-15, medio de McCoy 5A, medio M199 (M199E-con base salina de Earle), medio M199 (M 199H con base salina de Hank), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-E con base salina de Earle), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-H con base salina de Hank), y medio
50 esencial mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre otros muchos, incluyendo medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams 'G, Neuman y Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferido para su uso en la presente invención es DMEM. Estos y otros medios útiles están disponibles de GIBCO, Grand Island, NY, EE.UU.
55 y Biological Industries, Bet HaEmek, Israel, entre otros. Varios de estos medios se resumen en Methods in Enzymology, Volumen LVIII, "Cell Culture", pp. 62 72, editado por William B. Jakoby y Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

El medio puede ser suplementado p. ej. con suero tal como suero fetal bovino o de otras especies, y, opcionalmente, o alternativamente, factores de crecimiento, citocinas, y hormonas (por ejemplo, hormona del

crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor estimulante de colonias de macrófagos, ligando c-kit/factor de células madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y proteína morfogenética ósea a concentraciones entre picogramos /ml y miligramos/ml.

Se reconoce también que se pueden añadir componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica del cultivo de células. Adicionalmente, se pueden añadir componentes para mejorar el proceso de diferenciación cuando sea necesario (véase más adelante).

Una vez que las células adherentes están disponibles pueden ser pasadas a configuraciones tridimensionales (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue). Sin embargo se apreciará que las células pueden ser transferidas a una matriz configurada 3D inmediatamente después del aislamiento (como se ha mencionado anteriormente en el presente texto).

Por tanto, el material adherente de este aspecto de la presente invención está configurado para el cultivo 3D proporcionando con ello una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células estromales de forma que imite la infraestructura del tejido (por ejemplo, placenta).

Por ejemplo, para una matriz de crecimiento de 0,5 mm de altura, el incremento es en un factor de al menos de 5 a 30 veces, calculado por proyección sobre una base de la matriz de crecimiento. Tal incremento en un factor de aproximadamente 5 a 30 veces, es por capa unidad, y si se usa una diversidad de tales capas, ya sea apiladas o separadas por espaciadores o similares, el factor de 5 a 30 veces es válido para cada una de tales estructuras. Cuando se usa la matriz en forma de lámina, preferiblemente láminas de fibra no tejida, o láminas de polímeros espumadas de poro abierto, el espesor preferido de la lámina es de aproximadamente 50 a 1000 μm o más, proporcionándose la adecuada porosidad para la entrada de células, entrada de nutrientes y para la eliminación de productos de desecho de la lámina. De acuerdo con una realización preferida los poros tienen un diámetro efectivo de 10 μm a 100 μm . Tales láminas se pueden preparar a partir de fibras de diversos espesores, estando el intervalo preferido de espesor de fibra o de diámetro de fibra entre aproximadamente 0,5 μm y 20 μm , las fibras aún más preferidas están en el intervalo de 10 μm a 15 μm de diámetro.

Las estructuras de la invención pueden ser soportadas, o aún mejor unidas a ella, por una lámina o pantalla de soporte poroso que proporciona estabilidad dimensional y resistencia física.

Tales láminas de matriz también pueden ser cortadas, perforadas, o trituradas para proporcionar partículas con un área proyectada del orden de aproximadamente 0,2 mm^2 a aproximadamente 10 mm^2 , con el mismo orden de espesor (aproximadamente 50 a 1000 μm).

Otros detalles relativos a la fabricación, uso y/o ventajas de la matriz de crecimiento que se usó para llevar a la práctica la presente invención se describen en la patente de EE. UU. nº 5.168.085 y, en particular, la nº 5.266.476.

La superficie adherente puede tener una forma elegida entre el grupo que consiste en cuadrados, anillos, discos, y cruciformes.

Para la producción a gran escala, el cultivo se realiza preferiblemente en un biorreactor 3D.

Los ejemplos de tales biorreactores incluyen, pero sin limitarse a ellos, un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo y un biorreactor de lecho estacionario.

Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, un biorreactor de flujo pistón tridimensional (3D) (como se describe en la patente de EE. UU. nº 6.911.201.) es capaz de soportar el crecimiento y mantenimiento prolongado de células estromales. En este biorreactor, las células estromales se siembran sobre portadores porosos hechos de una matriz de tela no tejida de poliéster, empaquetada en una columna de vidrio, permitiendo así la propagación de gran número de células en un volumen relativamente pequeño.

La matriz usada en el biorreactor de flujo pistón puede ser en forma de lámina, láminas de fibra no tejida, o láminas de polímeros espumados de poro abierto, el espesor preferido de la lámina es aproximadamente 50 a 1.000 μm o más, proporcionándose la adecuada porosidad para la entrada de células, la entrada de nutrientes y la eliminación de productos de desecho de la lámina.

Otros biorreactores 3D que pueden usarse con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, un biorreactor de tanque agitado continuo, donde se alimenta en continuo un medio de cultivo en el biorreactor y se extrae continuamente un producto para mantener un estado estacionario constante en el tiempo dentro del reactor]. Un biorreactor de tanque agitado con una cesta de lecho fibroso es disponible por ejemplo en New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ). Un biorreactor de lecho fijo, un biorreactor *air-lift* o de elevación por aire, en el que típicamente se alimenta aire en la parte inferior de un tubo de arrastre central que fluye hacia arriba, mientras que se forman burbujas, y se separa el gas de escape en la parte superior de la columna], un biorreactor de perfusión de

siembra de células con espumas poliactivas [como se describe en Wendt, D. et al, Biotechnol. Bioeng 84: 205 - 214, (2003)] andamios porosos de poli (ácido L-láctico) tubular (PLLA) en un biorreactor de perfusión de flujo radial [como se describe en Kitagawa et al, Biotechnology and Bioengineering 93 (5): 947 - 954 (2006). Otros biorreactores que pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención se describen en la patente de EE. UU. n° 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186.

La siembra de células se efectúa preferiblemente a 100.000 – 1.500.000 células/mm en la siembra.

Las células se recolectan preferentemente una vez que se ha alcanzado al menos aproximadamente un 40% de confluencia, 60% de confluencia o 80% de confluencia, preferentemente evitando al mismo tiempo la diferenciación no controlada y la senescencia.

El cultivo se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 20 días, un mes o incluso más. Se apreciará que el cultivo en un biorreactor puede prolongar este período. Pueden también efectuarse pasajes para aumentar el número de células.

Las células adherentes de la presente invención comprenden preferiblemente al menos un "fenotipo de célula madre estromales".

Como se usa en el presente texto la expresión "un fenotipo de células madre estromales" se refiere a un fenotipo estructural o funcional típico de una célula madre estromal (es decir, mesenquimal) derivada de la médula ósea.

Como se usa en el presente texto la expresión "célula madre" se refiere a una célula que no está diferenciada terminalmente.

Así, por ejemplo, las células pueden tener forma de huso. Alternativa o adicionalmente las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (por ejemplo, marcador de superficie) típico de las células madre estromales. Los ejemplos de marcadores de superficie de células madre estromales (positivos y negativos) incluyen, pero sin limitarse a ellos, CD105+, CD29 +, CD44+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, CD80-, CD19-, CD5-, CD20-, CD11B -, CD14-, CD 19-, CD79-, HLA-DR- y FMC7-. Otros marcadores de células madre estromales incluyen pero sin limitarse a ellos tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

Los ejemplos de fenotipos funcionales típicos de las células madre estromales incluyen, pero sin limitarse a ellos, actividad de supresión de células T (no estimulan las células T y por el contrario las suprimen), la actividad de apoyo de células madre hematopoyéticas, así como la diferenciación adipogénica, hepatogénica, osteogénica y neurogénica.

Cualquiera de estas características estructurales o funcionales se puede utilizar para calificar las células de la presente invención (véanse los Ejemplos 1 - 2 de la sección de Ejemplos que sigue).

Las poblaciones de células generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas se caracterizan por un perfil único de expresión de proteína como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. Así, por ejemplo, las células adherentes de placenta o de tejido adiposo generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas, son capaces de expresar y/o segregar niveles elevados de factores seleccionados. Por ejemplo, tales células expresan o segregan SCF, Flt-3, H2AF o ALDH X al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o preferiblemente 12 veces mayores que los expresados o segregados por las células adherentes de la placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D. Adicional o alternativamente, la población de células de la presente invención segrega o expresa IL-6, EEEF2, RCN2 o CNN1 a un nivel menos de 2, 3 o 5 veces mayor que el expresado o segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo cultivadas en un cultivo 2D. Adicional o alternativamente, la población de células de la presente invención se caracteriza por un nivel de expresión más bajo de otras varias proteínas en comparación con las células cultivadas 2D. Así, por ejemplo, segregan o expresan menos de 0,6, 0,5, 0,25 o 0,125 del nivel de expresión de Hnrph1, precursor de la isoforma 2 del antígeno CD44, Papss2 o rpl7a expresado o segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo cultivadas en un cultivo 2D.

Mientras desarrollaban la práctica de la presente invención los presentes inventores se han dado cuenta de que las células estromales adherentes, y en particular 3D-ASCs, mostraban actividad inmunosupresora. Como se muestra en el Ejemplo 3 de la sección de ejemplos que sigue, se encontró que las células estromales adherentes, y en particular las 3D-ASCs, suprimen la reacción inmunitaria de las células mononucleares de sangre del cordón umbilical humano en un ensayo de MLR. Así, las células de la presente invención pueden comprender actividades biológicas que pueden utilizarse preferentemente en la clínica (por ejemplo, actividad de supresión de células T, actividad de soporte de células madre hematopoyéticas).

Al desarrollar la práctica de la presente invención los presentes inventores se han dado cuenta de que el medio acondicionado de las células de la presente invención puede comprender actividades biológicas que pueden ser usadas preferentemente en la clínica (por ejemplo, actividad de supresión de células T, actividad de soporte de células madre hematopoyéticas).

Así pues, la presente invención contempla además la recolección del medio acondicionado y su uso tal cual o después de otras etapas de concentración, enriquecimiento o fraccionamiento utilizando métodos que son bien

conocidos en la técnica. Preferiblemente se obtiene un medio acondicionado de la presente a partir de un cultivo semilogarítmico de células de alta viabilidad.

Como se mencionó anteriormente, las células y el medio acondicionado de la presente invención se caracterizan por un fenotipo de célula madre estromal y como tal se pueden usar en cualquier investigación y aplicación clínica que pueda beneficiarse del uso de tales células.

El injerto y la iniciación de la hematopoyesis por HSCs trasplantadas dependen de procesos complejos que incluyen la migración dirigida, siguiendo un gradiente de quimiocinas través de la barrera de células endoteliales, a la médula ósea y alojamiento en los nichos apropiados, mientras se establecen contactos físicos entre las células trasplantadas, ECM y células mesenquimales de los nichos. Todos estos procesos implican una serie compleja de moléculas, tales como citocinas, hormonas, esteroides, proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, interacción célula a célula y proteínas de adhesión, y proteínas de la matriz.

Se sabe que sólo 1 - 5% de HSCs transfundidas se detectan en la BM del receptor 2 - 3 días después del trasplante [Kerre et al, J. Immunol. 167: 3692 - 8 (2001); Jetmore et al., Blood. 99: 1585 - 1593 (2002)].

La contribución de MSCs al injerto hematopoyético es en parte por la inhibición de la producción de células T derivadas del donante, que causan la enfermedad del injerto contra el huésped [GvHD, Charbord P., y Moore, K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044: 159 - 167 (2005); Maitra B, et al., *Bone Marrow Transplant*, 33 (6): 597 - 604. (2004); patente de EE. UU. n° 6.010.696 y 6.555.374]; y parte proporcionando un soporte de las células madre hematopoyéticas (HSCs) (es decir, que sostienen y ayudan a la proliferación, la maduración y/o la migración dirigida de las células madre hematopoyéticas).

Como se muestra en el Ejemplo 2 de la sección de ejemplos que sigue, se encontró sorprendentemente que las células adherentes derivadas de la placenta y del tejido adiposo sirven de apoyo del injerto de HSCs incluso después de la quimioterapia.

Dados estos resultados es concebible que las células o los medios de comunicación de la presente invención pueden utilizarse en cualquier aplicación clínica para la que se use trasplante de células madre estromales.

Así pues, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una condición médica (por ejemplo, patología, enfermedad, síndrome) que pueda beneficiarse del trasplante de células madre estromales en un sujeto en necesidad del mismo.

Como se usa en el presente texto, el término "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una patología y/o causar la reducción, la remisión o la regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología, y de manera similar, se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una patología. Preferiblemente, el término "tratar" se refiere a aliviar o disminuir un síntoma asociado con una enfermedad cancerosa. Preferiblemente, el tratamiento cura, por ejemplo elimina sustancialmente, los síntomas asociados con la condición médica.

Como se usa en el presente texto la expresión "una condición médica que puede beneficiarse del trasplante de células madre estromales" se refiere a cualquier condición médica que pueda ser aliviada por la administración de células/medios de la presente invención.

Los términos o expresiones "trasplante", "reemplazo de células" o "injerto" se usan indistintamente en este documento y se refieren a la introducción de las células de la presente invención en el tejido diana.

Como se usa en el presente texto, el término "sujeto" se refiere a cualquier sujeto (por ejemplo, un mamífero), preferiblemente un sujeto humano.

El método de este aspecto de la presente invención comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de las células o medios de la presente invención (descritos anteriormente en el presente texto), tratando de este modo la condición médica que puede beneficiarse del trasplante de células madre estromales en el sujeto.

Las células que se pueden administrar de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen las células adherentes descritas anteriormente que se pueden cultivar en disposiciones tridimensionales, así como los derivados mesenquimales y no mesenquimales diferenciados parcialmente o terminalmente de las mismas.

Los métodos para derivar células específicas del linaje de las células madre estromales de la presente invención son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 5.486.359, 5.942.225, 5.736.396, 5.908.784 y 5.902.741.

Las células pueden ser nativas o modificadas genéticamente para derivar un linaje de interés (véase la solicitud de patente de EE. UU. n° 20030219423).

Las células y los medios pueden ser de origen autólogo o no autólogo (es decir, alogénicos o xenogénicos) de preparados frescos o congelados (por ejemplo, crio-conservados).

Dependiendo de la condición médica, se puede administrar al sujeto otros fármacos (por ejemplo, inmunomoduladores, quimioterapia, etc.) o células.

- 5 Así, por ejemplo, para mejorar el injerto de células madre (por ejemplo, aumentando el número de HSCs viables en la BM receptora y mejorar de forma óptima el recuento de glóbulos blancos normales) las células/medios de la presente invención se pueden administrar antes de, al mismo tiempo, o después del trasplante de HSCs.

10 Preferiblemente las HSCs y células estromales comparten antígenos HLA comunes. Preferiblemente, las HSCs y células estromales son de un solo individuo. Alternativamente, las HSCs y células estromales son de individuos diferentes.

El término o la expresión "trasplante", "reemplazo de células" o "injerto" se usan indistintamente en el presente texto y se refieren a la introducción de las células de la presente invención en el tejido diana. Las células se pueden derivar del receptor o de un donante alogénico o xenogénico.

- 15 Dado que es probable que las células no autólogas induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al cuerpo, se han desarrollado varios planteamientos para reducir la probabilidad de rechazo de las células no autólogas. Estos incluyen la supresión del sistema inmunitario del receptor o bien la encapsulación de las células no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes antes del trasplante.

20 Las técnicas de encapsulación se clasifican generalmente como microencapsulación, que implica pequeños vehículos esféricos, y macroencapsulación, que implica membranas más grandes de lámina plana y fibra hueca (Uludag, H. et al. Technology of mammalian cell encapsulation. Adv. Drug Deliv. Rev. 2000; 42: 29 - 64).

25 Los métodos de preparación de microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo los descritos por Lu MZ, et al., Cell encapsulation with alginate and alphaphenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng. 2000, 70: 479 - 83, Chang T.M. y Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol. Biotechnol. 2001, 17: 249 - 60, y Lu MZ, et al., A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylidene acetate). J. Microencapsul. 2000, 17: 245 - 51.

30 Por ejemplo, se preparan microcápsulas complejando colágeno modificado con una envoltura de ter-polímero de 2-hidroxietil metilacrilato (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), dando por resultado un espesor de la cápsula de 2 - 5 µm. Tales microcápsulas se pueden encapsular más con envolturas adicionales de 2 - 5 µm de ter-polímero con el fin de conferir una superficie lisa cargada negativamente y minimizar la absorción de proteínas del plasma (Chia, S. M. et al. Multilayered microcapsules for cell encapsulation Biomaterials. 2002 23: 849 - 56).

35 Otras microcápsulas están basadas en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol. Ther. 2003, 5: 665 - 8) o sus derivados. Por ejemplo, se pueden preparar microcápsulas mediante la complejación con polielectrolito entre los polianiones alginato de sodio y sulfato de celulosa sódico con el polication hidrocloreuro de poli(metilen-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

40 Se apreciará que la encapsulación de células mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Así pues, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión, y en las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se reduce de 1 mm a 400 µm (Canaple L. et al., Improving cell encapsulation through size control. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2002; 13: 783 - 96). Además, se encontró que las biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado tan pequeño como 7 nm, obtuvieron una química de superficie hecha a medida y microarquitecturas precisas inmunoaislaron con éxito los microentornos de las células (Williams D. Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med. Device Technol. 1999., 10: 6 - 9; Desai, T. A. Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin. Biol. Ther. 2002, 2: 633 - 46).

50 Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitarse a ellos, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, bloqueantes del TNF alfa, un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria, y fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAIDs). Los ejemplos de NSAIDs incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido acetyl salicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores Cox-2 y tramadol.

55 En cualquiera de los métodos descritos en el presente texto, las células o los medios se pueden administrar *per se* o bien, preferiblemente, como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente texto una "composición farmacéutica" se refiere a un preparado de uno o más de los conjugados químicos descritos en el presente texto, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

- 5 En adelante, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa en un sujeto y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Los ejemplos de portadores, sin limitaciones, son propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

- 10 En el presente texto, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un compuesto. Los ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéutico es una solución acuosa de solución salina.

- 15 Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Se puede administrar la composición farmacéutica de forma sistémica (como se detalló anteriormente en el presente texto). Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica localmente, por ejemplo por medio de la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región del tejido de un paciente.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elaborarse por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsionamiento, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

- 25 Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención pueden entonces formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos formando preparados que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

- 30 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en forma de soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosal se utilizan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se ha de permear. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

- 35 Para cualquier preparado utilizado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo de células. Preferiblemente, se formula una dosis en un modelo animal para conseguir una concentración o título deseado. Tal información puede utilizarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en las personas.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente texto pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales experimentales.

- 40 Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, la vía de administración y la dosificación exactas pueden ser escogidas por cada médico teniendo en cuenta la condición del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p. 1). Por ejemplo, los pacientes de Parkinson pueden monitorizarse sintómicamente en relación con la mejora de las funciones motrices que indican una respuesta positiva al tratamiento.

- 45 Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico.

- 50 La cantidad de la dosificación y su intervalo se pueden ajustar individualmente a niveles del ingrediente activo que sean suficientes para regular eficazmente la síntesis de neurotransmisores por las células implantadas. Las dosificaciones necesarias para lograr el efecto deseado dependerá de las características individuales y de la vía de administración. Pueden ser utilizados ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la condición a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de varias, durando el curso del tratamiento entre varios días y varias semanas o hasta que se logra la disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, desde luego, del individuo que está siendo tratado, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico responsable, etc. La dosis y la pauta de administración responderán a una cuidadosa y continua vigilancia o monitorización de la condición cambiante individual. Por ejemplo, a un paciente tratado de Parkinson se le administrará una cantidad de células que es suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, basándose en las indicaciones de la monitorización.

Después del trasplante, las células de la presente invención sobreviven preferiblemente en la zona enferma durante un período de tiempo (por ejemplo al menos 6 meses), para que se observe un efecto terapéutico.

Las composiciones que incluyen el preparado de la presente invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también pueden ser preparadas, puestas en un recipiente apropiado y etiquetadas para el tratamiento de una condición indicada.

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contiene el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o material plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede contener una notificación asociada con el recipiente en una forma prescrita por la agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, la cual notificación refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser de un etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para los fármacos con receta o de un inserto de producto aprobado.

EJEMPLOS

Se hace ahora referencia a los ejemplos que siguen, que junto con las descripciones anteriores ilustran la invención de una manera no limitante.

De un modo general, la nomenclatura utilizada en el presente texto y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I - III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y otros, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1 - 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las que se exponen en las patentes de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I - III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I - III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, patente de EE. UU. n° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. L, ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1 - 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, California (1990); Marshak et al, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en el presente documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector. Toda la información contenida en el mismo se incorpora en el presente texto como referencia.

EJEMPLO 1

Producción y cultivo de células estromales adherentes (ASC) a partir de la médula ósea, placenta y tejidos adiposos.

Se cultivaron células adherentes en un sistema de biorreactor que contiene portadores 3D para producir células 3D-ASC, caracterizadas por un perfil de expresión de marcador celular específico. La eficiencia de crecimiento fue probada mediante recuento de células. La capacidad de diferenciación de estas células se ensayó mediante el cultivo en un medio de diferenciación.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

Células estromales de la médula ósea. Se obtuvieron células estromales de la médula ósea (BM) de aspirado de médula esternal de donantes hematológicamente sanos sometidos a cirugía a corazón abierto o biopsia de BM. Los aspirados de médula se diluyeron 3 veces en solución salina equilibrada de Hank (HBSS; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) y se sometieron a centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific

Corp. Sunnyvale, CA). A continuación se recogieron las células mononucleares de médula ósea ($<1.077 \text{ g/cm}^3$), se lavaron 3 veces en HBSS y se resuspendieron en medio de crecimiento [DMEM (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel) suplementado con 10% de FCS (Gibco BRL), mercaptoetanol 10^{-4} M (Merck, White House Station, NJ), mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml; Beit Ha'emek), L-glutamina 2 mM (Beit Ha'Emek)].

5 Las células procedentes de donantes individuales se incubaron por separado en matraces de cultivo de tejidos (Corning, Acton, MA) a 37°C (5% CO_2) con cambio semanal de medio de cultivo. Las células se dividen cada 3 - 4 días usando 0,25% de tripsina-EDTA (Beit Ha'Emek). Después de 2 - 40 pasajes, cuando se alcanza el 60-80% de confluencia, se recogieron las células para su análisis o para el cultivo en biorreactores.

Células estromales derivadas de la placenta.- Partes internas de una placenta de parto a término (centro médico Bnei Zion, Haifa, Israel) se cortaron en condiciones estériles, se lavaron 3 veces con tampón de Hank y se incubaron durante 3 horas a 37°C con colagenasa al 0,1% (1 mg /ml de tejido; Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO). Usando un pipeteo suave, las células suspendidas se lavaron después con DMEM suplementado con FCS al 10%, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, se sembraron en frascos de 75 cm^2 y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos bajo condiciones humidificadas con 5% de CO_2 .

10 Posteriormente, las células se dejaron adherir a una superficie de material plástico durante 72 horas después de lo cual se cambió el medio cada 3 - 4 días. Al alcanzar el 60 - 80% de confluencia (generalmente a los 10 - 12 días), las células se despegaron del matraz de crecimiento utilizando 0,25% de tripsina-EDTA y se sembraron en frascos nuevos. Las células cultivadas se recogieron después para su análisis o para el cultivo en biorreactores.

Células estromales derivadas de tejido adiposo. Se obtuvieron células estromales a partir de tejido adiposo humano de procedimientos de liposucción (Rambam Haifa, Israel). El tejido adiposo se lavó extensamente con volúmenes iguales de PBS y se digirió a 37°C durante 30 min con colagenasa (20 mg/ml). Las células se lavaron a continuación con DMEM que contenía 10% de FCS, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml) y L-glutamina y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min a temperatura entorno, se resuspendieron con solución para lisis (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, para desechar los glóbulos rojos) se centrifugaron y se resuspendieron con DMEM que contiene 10% de FCS, mezcla de Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml) y L-glutamina. Las células lavadas se sembraron después en un matraz con medio de cultivo de tejidos estéril a $3 - 10 \times 10^7$ células/matraz. Al día siguiente las células se lavaron con PBS para eliminar los RBC residuales y las células muertas. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos bajo condiciones de humidificación con 5% de CO_2 . El medio se cambió cada 3 - 4 días. Cuando se alcanzó el 60 - 80% de confluencia (normalmente 10 - 12 días), las células se despegaron del matraz de crecimiento usando 0,25% de tripsina-EDTA y se sembraron en frascos nuevos. Después de 2 - 40 pasajes, cuando las células alcanzaron el 60 - 80% de confluencia, las células se recolectaron para su análisis o para el cultivo en biorreactores

Biorreactor de flujo pistón PluriX™ - El biorreactor de flujo pistón PluriX™ (Pluristem, Haifa, Israel; como se ilustra en la figura 1g, véase también la patente de EE. UU. n° 6.911.201.), se cargó con 1 - 100 ml de portadores porosos 3D empaquetados (4 mm de diámetro) hechos de una matriz de tela no tejida de poliéster. Estos portadores permiten la propagación de gran número de células en un volumen relativamente pequeño. El material de vidrio fue diseñado y fabricado por Pluristem. El biorreactor se mantuvo en una incubadora a 37°C , con un caudal regulado y controlado por una válvula (6a en la Figura 1 g), y una bomba peristáltica (9 en la Figura 1 g). El biorreactor contiene un punto de muestreo e inyección (4 en la Figura 1g), que permite la siembra secuencial de células. El medio de cultivo fue suministrado a pH 6,7 - 7,4 desde un depósito (1 en la Figura 1g). Se suministró al depósito una mezcla de gas filtrado (2,3 en la Figura 1g), que contiene aire/ CO_2 / O_2 en diferentes proporciones, dependiendo de la densidad de células en el biorreactor. La proporción de O_2 estaba adaptada al nivel de O_2 disuelto en la salida del biorreactor, determinado por un monitor (6 en la Figura 1g). La mezcla de gas era suministrada al reservorio a través de tubos de silicona o de un difusor (Degania Bet, Emek Hayarden, Israel). El medio de cultivo se pasó a través de un recipiente de separación (7 en la Figura 1g), que permite la recolección de las células no adherentes en circulación. La circulación del medio fue obtenida por una bomba peristáltica (9 en la Figura 1g). El biorreactor estaba equipado además con un punto de muestreo adicional (10 en la Figura 1 g) y recipientes para el intercambio continuo de medio.

Producción de células estromales adherentes 3D (3D-ASC). Cultivos de células adherentes humanas primarias 2D no-confluentes, cultivadas como se ha descrito antes, fueron tripsinizados, se lavaron, se resuspendieron en DMEM suplementado con 10% FBS, mezcla Pen-Strep -Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, y se sembraron ($10^3 - 10^5$ células/ml) a través de un punto de inyección sobre los soportes 3D en un biorreactor de flujo pistón estéril (véase la Figura 1g). Antes de la inoculación, el biorreactor se llenó con PBS-Ca-Mg (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel), se trató en autoclave (120°C , 30 min) y se lavó con medio de crecimiento de Dulbecco que contenía 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y una mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml: 100 $\mu\text{g/ml}$: 1,25 un/ml). El flujo se mantuvo a razón de 0,1 - 5 ml/min. El proceso de siembra implicó el cese de la circulación durante 2 - 48 horas, permitiéndose así que las células se sedimenten en los portadores. El biorreactor se mantuvo bajo una temperatura (37°C) y unas condiciones de pH (pH = 6,7 a 7,4) controladas; usando una incubadora suministrada con aire estéril y CO_2 según las necesidades. El medio de cultivo fue reemplazado 2 - 3 veces a la semana. El medio de circulación se reemplazó con medio DMEM fresco, en intervalos de 4 hr a 7 días. A una densidad de $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células/ml (después de 12 - 40 días de crecimiento), el volumen medio total se retiró del biorreactor y el biorreactor y los portadores se lavaron 3 - 5 veces con PBS. Las células 3D-ASC fueron

después despagadas de los portadores con tripsina-EDTA; (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel; 3 - 15 minutos con agitación suave, 1 - 5 veces) y después se resuspendieron en DMEM y se criopreservaron.

Ensayos biológicos de calidad de 3D-ASC. Se descongelaron y se recomptaron las células 3D-ASC criopreservadas. Para la evaluación de la viabilidad celular, se sembraron 2×10^5 células en un matraz de cultivo de tejidos de 150 cm² y se evaluó su adherencia y capacidad de repoblación dentro de los 7 días siguientes a la siembra. A continuación, el fenotipo marcador de membrana 3D-ASC se analizó usando un citómetro de flujo de anticuerpos monoclonales de fluorescencia (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Comparación entre el perfil de marcador de membrana celular de las células adherentes cultivadas 3D y 2D usando ensayos de citometría de flujo. 100.000 - 200.000 células adherentes procedentes de cultivos 2D y cultivos de sistema de flujo 3D se suspendieron en 0,1 ml de medio de cultivo en un tubo de 5 ml y se incubaron (4 °C, 30 min, condiciones de oscuridad) con concentraciones de saturación de cada uno de los MABs siguientes: CD90 anti-humano conjugado con FITC (Chemicon International Inc. Temecula, CA), CD73 anti-humano conjugado con PE (Becton Dickinson, San Jose, CA), CD 105 anti-humano conjugado con PE (eBioscience, San Diego, CA), CD29 anti-humano conjugado con FITC (eBioscience, San Diego, CA), CD45 anti-humano conjugado con Cy7-PE (eBioscience), CD19 anti-humano conjugado con PE (IQProducts, Groningen, Países Bajos), MAb CD 14 anti-humano conjugado con PE (IQProducts), CD11b anti-humano conjugado con FITC (IQProducts) y CD34 anti-humano conjugado con PE (IQProducts) o con MAb HLA-DR anti humano conjugado con FITC (IQProducts). Después de la incubación las células se lavaron dos veces en PBS enfriado con hielo que contiene 1% de FCS inactivado por calor, se resuspendieron en 500 µl de formaldehído al 0,5% y se analizaron usando el citómetro de flujo FC-500 (Beckman Coulter, Fullerton, A).

Comparación entre el perfil de proteínas de células adherentes cultivadas 3D y 2D usando análisis de espectrometría de masas. ASCs derivadas de cultivo 2D y 3D fueron producidas a partir de placenta como se describió anteriormente. Brevemente expuesto, los cultivos 2D fueron producidos cultivando $0,3 - 0,75 \times 10^6$ células en frascos de 175 cm² durante 4 días bajo atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37 °C, hasta alcanzar el 60 - 80% de confluencia. Los cultivos 3D fueron producidos sembrando $2 - 10 \times 10^6$ células/gramo en un biorreactor que contiene 2000 portadores, y cultivando durante 18 días. Después de la recolección, las células se lavaron (x 3) para eliminar todo el suero, se sedimentaron y se congelaron. Las proteínas se aislaron a partir de sedimentos [utilizando kit Tri Reagent (Sigma, Saint Louis, EE.UU.) y se digirieron con tripsina y se marcaron con reactivo iTRAQ (Applied Biosciences, Foster City, CA)], de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Brevemente expuesto, los reactivos son reactivos de etiquetado isobáricos no poliméricos. Los péptidos de cada muestra se marcan con una de las cuatro etiquetas isobáricas, codificadas con isótopos a través de sus cadenas laterales N-terminal y/o de lisina. Las cuatro muestras marcadas se mezclan y los péptidos se analizan con espectrometría de masas. En la fragmentación del péptido, cada etiqueta libera un ion reportero de masa distinta; por tanto la relación de los cuatro reporteros da las abundancias relativas del péptido dado en una muestra, (información en: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/00113379.pdf>).

Se realizó el análisis proteómico de ASCs derivados de placenta del cultivo 2D frente al cultivo 3D en el centro proteómico Smoler (departamento de Biología, Technion, Haifa, Israel), utilizando LC-MS/MS en QTOF-Premier (Waters, San Francisco, CA) con la identificación y el análisis hechos por software Pep-Miner [Beer, I., et al., Proteomics, 4, 950 - 60 (2004)] frente a la parte humana de la base de datos nr. Las proteínas analizadas fueron: ribonucleoproteína H1 nuclear heterogénea (Hnrp1 GeneBank nº de registro NP_005511), la familia de la histona H2A (H2AF, GenBank nº de registro NP_034.566.1), factor de alargamiento de la traducción eucariótica 2 (EEEF2, GeneBank nº de registro NP_031.933.1), reticulocalbina 3, dominio de unión de EF-hand calcio (RCN2, GeneBank nº de registro NP_065 701), precursor de isoforma 2 del antígeno CD44 (GenBank nº de registro NP_001001389, músculo liso calponina 1 básico (CNN1, GenBank nº de registro NP_001290), 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 isoforma a (Papss2, GeneBank nº de registro NP_004661), proteína ribosómica L7a (rpL7a, GeneBank nº de registro NP_000963) y aldehído deshidrogenasa X (ALDH X, GeneBank nº de registro P47738). Cada experimento se realizó dos veces. A causa de la naturaleza del análisis, cada proteína se analizó de acuerdo con el número de péptidos de los cuales apareció en una muestra (2-20 apariciones de una proteína en cada análisis).

Comparación entre las proteínas segregadas en células adherentes cultivadas 3D y 2D utilizando ELISA. ASCs de procedimientos de cultivo derivados 2D y 3D producidas a partir de la placenta, se produjeron como se ha descrito anteriormente, con cultivos 3D durante un tiempo de 24 días. A continuación se recogieron los medios acondicionados y se analizaron en relación con ligando Flt-3, IL-6, trombopoyetina (TPO) y factor de células madre (SCF), mediante ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) en tres experimentos independientes. Los resultados se normalizaron para 1×10^6 células/ml.

Medio de diferenciación de osteoblastos. La diferenciación osteogénica se evaluó cultivando células en un medio de diferenciación de osteoblastos consistente en DMEM suplementado con 10% de FCS, dexametasona 100 nM, ácido ascórbico 2-fosfato 0,05 mM, B-glicerofosfato 10 mM, durante un período de 3 semanas. La matriz calcificada se indicó mediante tinción con rojo de alizarina S y la fosfatasa alcalina se detectó mediante el kit de ensayo de fosfatasa alcalina (todos los reactivos procedentes de Sigma-Aldrich, St. Lewis, MO).

RESULTADOS

El Sistema de biorreactor PluriX™ crea un microentorno similar al fisiológico.

Con el fin de proveer unas condiciones de cultivo eficientes para las células adherentes, se ha creado artificialmente un entorno similar al fisiológico (representado en la Figura 1a), usando el Biorreactor PluriX (Pluristem, Haifa, Israel; el portador se ilustra en la Figura 1g y se muestra antes de la siembra en la Figura 1b). Como se muestra en las Figuras 1c-f, las células 3D-ASC producidas por la médula ósea se cultivaron con éxito y se expandieron sobre la matriz 3D, 20 días (Figuras 1 b-c, 150 y 250 aumentos, respectivamente) y 40 días (Figuras 1c-d, 350 y 500 aumentos, respectivamente) después de la siembra.

Las células cultivadas en el sistema de Biorreactor PluriX se expandieron significativamente - Diferentes lotes de producción de células 3D-ASC derivadas de placenta fueron cultivados en los sistemas de biorreactor PluriX. La densidad de siembra fue de 13.300 células/portador (para un total de 2×10^6 células). Catorce días después de la siembra, la densidad celular se multiplicó por 15, alcanzando aproximadamente 200.000 células/portador (Figura 2), o 30×10^6 en un biorreactor de 150 portadores. En un experimento diferente, se sembraron las células en el biorreactor a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/ml y 30 días después de la siembra los portadores contenían un número de células más de 50 veces más elevado, es decir, aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/portador, o $0,5 \times 10^7$ células/ml. La densidad celular en los portadores en diversos niveles de la columna de crecimiento fue consistente, lo que indica una transferencia homogénea de oxígeno y nutrientes a las células. El sistema de cultivo 3D probó así que proporciona condiciones de soporte para el crecimiento y el mantenimiento prolongado de cultivos de células mesenquimales de alta densidad, que pueden cultivarse de manera eficiente hasta una cantidad suficiente con el fin de soportar el injerto y el éxito del trasplante.

Las 3D-ASCs muestran unas características de marcador de membrana únicas. Con el fin de definir la diferencia en el perfil de secreción de moléculas solubles y la producción de proteína, efectuadas por el procedimiento de cultivo 3D imitando el entorno del hueso, se efectuó el análisis FACS. Como se muestra en la Figura 3a, el análisis FACS de marcadores de células representa que 3D-ASCs muestran un patrón de expresión de marcador diferente del de células adherentes cultivadas en condiciones 2D. Las células cultivadas en 2D expresaron niveles significativamente más altos de marcadores de membrana positivos CD90, CD105, CD73 y CD29 marcadores de membrana en comparación con células cultivadas 3D. Por ejemplo, CD105 mostró un 56% de expresión en células cultivadas 3D frente al 87% en las células cultivadas 2D. Las ASCs de cultivos placenta tanto de 2D como de 3D, no expresaron ningún marcador de membrana hematopoyética (Figura 3b).

Las 3D-ASCs muestran un perfil de factores solubles único. El nicho hematopoyético incluye células de soporte que producen abundantes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Con el fin de definir mejor la diferencia entre ASCs cultivadas en 2D y 3D, se realizó mediante ELISA el perfil de las cuatro proteínas hematopoyéticas principales segregadas en los medios acondicionados de los cultivos ASC en 2D y 3D. Las Figuras 4a-c muestran que las células desarrolladas en condiciones de 3D produjeron medios de condición con niveles más altos de ligando Flt-3 (Figura 4a), IL-60 (Figura 4b), y SCF (Figura 4c), mientras que se detectaron niveles bajos de IL-6, y un nivel próximo a cero de ligando Flt-3 y SCF, en el medio de condición de los cultivos 2D. La producción de trombopoyetina (TPO) fue muy baja e igual en ambos cultivos.

Las 3D-ASCs muestran un perfil de proteína único en el análisis de espectrometría de masas. A fin de definir mejor la diferencia entre ASCs cultivadas 2D y 3D, el perfil de proteínas de estas células fue analizado por espectrometría de masas. La Figura 4d muestra que las ASCs cultivadas en 2D y 3D muestran un perfil de expresión de proteína notablemente diferente. Como se muestra en la Tabla 1 que sigue, las células cultivadas 3D muestran un nivel de expresión mucho más alto de H2AF y ALDH X (más de 9 y 12 veces más alto, respectivamente) y un nivel más alto de las proteínas EEEF2, RCN2 y CNN1 (aproximadamente 3, 2,5 y 2 veces, respectivamente). Además, las células cultivadas 3D muestran aproximadamente la mitad de los niveles de expresión de las proteínas Hnrph1 y precursor de isoforma 2 del antígeno CD44 y aproximadamente un tercio de los niveles de expresión de Paps2 y rPL7a.

Tabla 1

proteína	Nivel de proteínas (en relación al grupo reportero iTRAQ)			
	ASCs cultivadas 3D		ASCs cultivadas 2D	
	Av	SD	Av	SD
Hnrph1	1,434493	0,260914	0,684687	0,197928
H2AF	0,203687	0,288058	1,999877	0,965915
EEEF2	0,253409	0,130064	0,799276	0,243066
RCN2	0,54	0,25	1,34	0,26

precursor isoforma 2 del antígeno CD44	1,68	0,19	0,73	0,17
CNN1	0,77	0,15	1,55	0,17
Papss2	1,48352	0,314467	0,45627	0,137353
rpL7a	1,22	0,24	0,43	0,05
ALDH X	0,15847	0,22411	1,986711	0,212851

Las 3D-ASCs tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos. Con el fin de caracterizar más las 3D-ASCs, las células se cultivaron en medio de diferenciación de osteoblastos durante un período de 3 semanas. A continuación, se llevó a cabo la precipitación de calcio. Se demostró que las células diferenciadas producían calcio (representado en rojo en las Figuras 5a-b) mientras que las células testigo mantenían fenotipo de tipo fibroblasto y no demostraron mineralización (Figuras 5c-d). Estos resultados muestran que las 3D-ASCs derivadas de placenta tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en células osteoblastos.

EJEMPLO 2

Evaluación de la capacidad de 3D-ASC derivadas de placenta para mejorar el injerto de HSC.

El soporte de 3D-ASC del injerto de HSC fue evaluado por el nivel de células hematopoyéticas humanas (hCD45+) detectadas en ratones NOD-SCID inmunodeficientes irradiados sub-letalmente o pretratados con quimioterapia.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

Aislamiento de células CD34+. Se tomaron muestras de sangre de cordón umbilical bajo condiciones estériles durante el parto (Bnei Zion medical Center, Haifa, Israel) y las células mononucleares fueron fraccionadas usando centrifugación con gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield PoC As, Oslo, Noruega). Las células mononucleares descongeladas se lavaron y se incubaron con anticuerpos anti-CD34 y se aislaron usando midi MACS (Miltenyl Biotech, Bergish Gladbach, Alemania). Se agruparon células de más de una muestra para conseguir la cantidad deseada (50.000 – 100.000 células).

Detección de células trasplantadas en ratones irradiados. Ratones NOD-SCID (NOD-CB17-Prkdcscid/j; Harlan/Weizmann Inst., Rehovot, Israel) de siete semanas de edad machos y hembras fueron mantenidos en jaulas en sistema abierto estériles, se les administraron dietas estériles y agua ácida de autoclave. Los ratones fueron irradiados sub-letalmente (350 cGy) y a continuación (48 h después de la irradiación) se les sometió a trasplante con 50.000 – 100.000 células hCD34+ con o sin ASCs adicionales ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6) derivadas de placenta o de tejido adiposo (3 – 7 ratones en cada grupo), por inyección intravenosa en una vena lateral de la cola). Cuatro a seis semanas después del trasplante los ratones fueron sacrificados mediante dislocación y la BM se recogió enjuagando ambos fémures y tibias con tampón FACS (50 ml de PBS, 5 ml de FBS, 0,5 ml de azida sódica al 5%). Las células humanas en la BM de los ratones fueron detectadas mediante citometría de flujo, y el porcentaje de células que expresan marcador de células hematopoyéticas CD45 humanas y murinas se realizó incubando las células con CD45-FITC anti-humana (IQ Products, Groningen, Países Bajos). El umbral inferior para injerto humano inequívoco se designó como 0,5%.

Detección de células trasplantadas en ratones tratados con quimioterapia - Ratones NOD- SCID (NOD-CB17-JhkiHsd-scid; Harlan/Weizmann Inst., Rehovot, Israel) de 6,5 semanas de edad machos mantenidos como se describió anteriormente para los ratones irradiados, fueron inyectados intraperitonealmente con Busulfan (25 mg/kg durante 2 días consecutivos). Dos días después de la segunda inyección de Busulfan, se inyectó a los ratones células CD34+ solas o junto con $0,35 \times 10^6$ ASCs, producidas a partir de la placenta. 3,5 semanas después del trasplante los ratones fueron sacrificados y la presencia de células hematopoyéticas humanas fue determinada como se describió anteriormente para los ratones irradiados.

RESULTADOS.

Las 3D-ASC mejoraron el injerto de HSC en ratones irradiados. Células hematopoyéticas CD34+ humanas y 3D-ASC derivadas de placenta o de tejido adiposo fueron co-trasplantadas en ratones NOD-SCID irradiados. La eficiencia del injerto fue evaluada 4 semanas después del co-trasplante, y comparada con la de ratones trasplantados con solamente HSC. Como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 6, el co-trasplante de 3D-ASC y células UCB CD34+ tuvo como resultado tasas de injerto considerablemente más elevadas y niveles más altos de células humanas en la BM de los ratones receptores en comparación con los ratones tratados con UCB CD34+ solamente.

Tabla 2

Células trasplantadas	Promedio h-CD45	STDEV
CD34	3,8	7,9
ASC 3D CD34+ de placenta	5,1	12,2
ASC 3D CD34 + de tejido adiposo	8,7	9,6

3D-ASC mejoró el injerto de HSC en ratones tratados con quimioterapia. Células hematopoyéticas humanas CD34+ fueron co-trasplantadas con 500.000 2D-ASC o 3D-ASC derivadas de placenta, en ratones NOD-SCID pretratados con quimioterapia. La eficiencia del injerto se evaluó 5 semanas después del co-trasplante, y se comparó con los ratones trasplantados con HSCs solamente. Como se muestra en la Tabla 3, el co-trasplante de ASC y células UCB CD34+ tuvo como resultado niveles de injerto más altos en la BM de los ratones receptores en comparación con las células UCB CD34+ solas. Además, como se muestra en la Tabla 3, el nivel promedio de injerto fue más alto en los ratones co-trasplantados con células adherentes derivadas de placenta cultivadas en el sistema de biorreactor PluriX (3D-ASC) que en co-trasplante en los ratones con células del mismo donante, cultivadas en las condiciones de cultivo 2D estático convencionales (frasco).

Tabla 3

Células trasplantadas	Promedio h-CD45	STDEV
CD34	0,9	1,1
Cultivos 2D convencionales CD34+ de placenta	3,5	0,2
ASC 3D CD34+ de placenta	6,0	7,9

Los resultados de los análisis FACS mostrados en las Figuras 7a-b demuestran la ventaja del co-trasplante de ASC con hHSCs (Figura 7b), y la capacidad de ASC para mejorar la recuperación del sistema hematopoyético después del trasplante de HSCs.

Tomados en conjunto, estos resultados indican que las células ASCs pueden servir como soporte para mejorar la recuperación hematopoyética después del trasplante de HSCs (autólogo o alogénico). La capacidad de las 3D-ASCs para mejorar el injerto de células madre hematopoyéticas y/o progenitoras después del trasplante de HSCs puede resultar de la capacidad de 3D-ASC para segregar citocinas de apoyo de HSCs que pueden mejorar la migración, la autorrenovación y la capacidad de proliferación de las células trasplantadas, o de la capacidad de esas células para reconstruir el microentorno hematopoyético dañado que se necesita para la migración y la proliferación de las HSCs trasplantables.

EJEMPLO 3

Supresión de la respuesta de linfocitos por ASCs cultivadas en 2D y 3D.

Se encontró que las células estromales adherentes, y en particular las 3D-ASCs, suprimen la reacción inmunitaria de las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical humano en un ensayo de MLR.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

Ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR). Las propiedades inmunosupresoras e inmunoprivilegiadas de ASCs de procedimientos de cultivo derivados 2D y 3D producidas a partir de la placenta fueron realizadas mediante el ensayo de MLR, que mide la histocompatibilidad en el locus HLA, efectuada por la tasa de proliferación de linfocitos incompatibles en el cultivo mixto de células con respuesta (proliferantes) y estimuladoras (no proliferantes). Células mononucleares de la sangre del cordón umbilical humano (CB) (2×10^5) se usaron como células de respuesta y fueron estimuladas siendo co-cultivadas con cantidades iguales (10^5) de monocitos derivados de sangre periférica humana (PBMC) irradiados (3000 Rad) o con células adherentes cultivadas en 2D o 3D, producidas a partir de la placenta, o una combinación de células adherentes y PBMCs. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las células se co-cultivaron durante 4 días en medio RPMI 1640 (que contiene 20% de FBS bajo atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37 °C), en una placa de 96 pocillos. Las placas se pulsaron con 1 µCi de ³H-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo. Las células se recolectaron entonces sobre un filtro de fibra de vidrio y la absorción de timidina se cuantificó con un contador de centelleo.

RESULTADOS

La Figura 8 muestra la respuesta inmunitaria de las células CB representada por la elevada proliferación de estas células cuando se estimulan con PBMCs, lo que, sin pretender vincularse a ninguna teoría, está probablemente asociado con la proliferación de células T en respuesta a la incompatibilidad de HLA. Sin embargo, un nivel considerablemente más bajo de respuesta inmunitaria fue mostrado por estas células cuando se incuban con las células adherentes de la presente invención. Además, la respuesta inmunitaria CB a PBMCs se redujo sustancialmente cuando se co-incubaron con estas células adherentes. Así pues, de una manera similar a MSCs, se encontró que las ASCs tienen la capacidad potencial de reducir la proliferación de células T de las células del donante, típica de la GvHD. Aunque ambos cultivos, 2D y 3D, redujeron la respuesta inmunitaria de los linfocitos, y en línea con las otras ventajas de las 3D-ASCs descritas anteriormente, las 3D ASCs eran más inmunosupresoras.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que por razones de claridad se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación con en una realización única. En cambio, varias características de la invención que por razones de brevedad se describen en el contexto de una realización única, pueden también ser proporcionadas por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención ha sido descrita junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que varias alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, la cita o la identificación de cualquier referencia en esta solicitud no deben ser consideradas como la admisión de que tal referencia es disponible como técnica anterior a la presente invención.

En vista de lo que antecede, se apreciará que la memoria descriptiva comprende también los apartados siguientes:

1. Un método de expansión de células, comprendiendo el método cultivar células adherentes procedentes de la placenta o del tejido adiposo bajo condiciones de cultivo tridimensional, que soportan la expansión de las células.

2. Un método para producir un medio acondicionado, comprendiendo el método

(a) cultivar células adherentes a partir de la placenta y del tejido adiposo en condiciones de cultivo tridimensional que permiten la expansión de las células; y

(b) recolectar un medio acondicionado de dichas células adherentes expandidas, produciéndose así el medio acondicionado.

3. Una población de células generadas de acuerdo con el método del apartado 1.

4. Una población de células aislada que comprende células adherentes de placenta o de tejido adiposo, en donde dichas células adherentes segregan un nivel de al menos un factor elegido entre el grupo consistente en SCF, IL-6 y Flt-3 más elevado que el segregado por células adherentes de placenta o de tejido adiposo cultivadas en un cultivo 2D.

5. Una población de células aislada que comprende células adherentes de placenta o de tejido adiposo, en donde dichas células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína elegida entre el grupo que consiste en la familia de la histona H2A (H2AF), aldehído deshidrogenasa X (ALDH X) factor 2 de alargamiento de la traducción eucariótica (EEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión EF-hand calcio (RCN2) y calponina 1 básica músculo liso (CNN1), más elevado que el expresado por células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

6. Una población de células aislada que comprende células adherentes de placenta o de tejido adiposo, en donde dichas células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína elegida entre el grupo que consiste en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de la isoforma 2 del antígeno CD44, 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 isoforma a (Papss2) y proteína ribosómica L7a(rpL7a), menor que el expresado por células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

7. Una población aislada de células que comprende células adherentes de placenta o de tejido adiposo, en donde dichas células adherentes se caracterizan por una actividad inmunosupresora más elevada que la de células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.

8. La población aislada de células del apartado 7, en donde dicha actividad inmunosupresora comprende la reducción de la proliferación de células T.

9. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la población de células generada según el apartado 1.

10. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, el medio acondicionado producido según el apartado 2.

11. Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, la población de células aislada del apartado 4, 5, 6 o 7.
12. Un método de tratamiento de una condición que puede beneficiarse del trasplante de células estromales en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de células adherentes de un tejido elegido entre el grupo consistente en placenta y tejido adiposo, tratando así la condición que puede beneficiarse del trasplante de células madre en el sujeto.
13. Un método de tratamiento de una condición que puede beneficiarse del trasplante de células estromales en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un medio acondicionado de células adherentes derivadas de un tejido elegido entre el grupo consistente en placenta y tejido adiposo, tratando así la condición que puede beneficiarse del trasplante de células madre en el sujeto.
14. Un método para reducir una respuesta inmunitaria en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la población de células aislada de los apartados 3, 4, 5, 6 o 7, para reducir la respuesta inmunitaria en el sujeto.
15. 15. El método del apartado 14, en donde el sujeto es tratado con terapia celular.
16. El método del apartado 12 o 13, que comprende además administrar células madre.
17. El método del apartado 16, en donde dichas células madre comprenden células madre hematopoyéticas.
18. El método del apartado 16, en donde dichas células madre son administradas al mismo tiempo que dicho medio acondicionado o células adherentes.
20. 19. El método del apartado 16, en donde dichas células madre son administradas después de la administración de dicho medio acondicionado o células adherentes.
20. El método de los apartados 12 y 13, en donde dichas células adherentes se obtienen de un cultivo tridimensional.
25. 21. El método de los apartados 12 y 13, en donde dichas células adherentes se obtienen de un cultivo bidimensional.
22. El método de los apartados 12 y 13, en donde dicha condición se elige entre el grupo consistente en deficiencia de células madre, cardiopatía, enfermedad de Parkinson, cáncer, enfermedad de Alzheimer, ictus, quemaduras, pérdidas de tejido, pérdida de sangre, anemia, trastornos autoinmunitarios, diabetes, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD), trastornos neurodegenerativos, encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgen, esclerosis múltiple (MS), miastenia gravis (MG), síndrome de Guillain-Barré (GBS), tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) y enfermedad intestinal inflamatoria.
30. 23. El método o la población de células del apartado 1, 2, 3 o 20, en donde dicho cultivo tridimensional comprende un biorreactor 3D.
35. 24. El método del apartado 23, en donde dicho biorreactor se elige entre el grupo consistente en un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor de tanque agitado continuo y un biorreactor de lecho estacionario.
25. El método o población de células de cualquiera de los apartados 1, 2, 3 o 20, en donde dicho cultivo de dichas células se realiza bajo un flujo continuo de un medio de cultivo.
40. 26. El método o población de células de cualquiera de los apartados 1, 2, 3 o 20, en donde dicho cultivo tridimensional comprende un material adherente elegido entre el grupo consistente en un poliéster, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un poli(cloruro de vinilo), un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula cerámica, un matrigel, un componente de matriz extracelular, un colágeno, un poli(ácido L láctico), y una fibra de metal inerte.
45. 27. El método o población de células de cualquiera de los apartados 1, 2, 3 o 20, en donde dicho cultivo se realiza durante al menos 3 días.
28. El método o población de células del apartado 1, en donde dicho cultivo se realiza durante al menos 3 días.
29. El método o población de células de cualquiera de los apartados 1, 2, 3 o 20, en donde dicho cultivo se realiza hasta que dichas células adherentes alcanzan al menos un 60% de confluencia.
50. 30. Los métodos de los apartados 12 y 13, en donde la condición puede beneficiarse de la facilitación del injerto de células madre hematopoyéticas.

31. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 20, en donde dichas células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador positivo elegida entre el grupo que consiste en CD73, CD90, CD29 y CD105.
- 5 32. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 20, en donde dichas células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador negativo elegida entre el grupo que consiste en CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79.
33. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3 o 20, en donde dichas células adherentes segregan un nivel de al menos un factor elegido entre el grupo consistente en SCF, Flt-3 y IL-6 más elevado que el segregado por células adherentes procedentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 10 34. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3 o 20, en donde dichas células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína elegida entre el grupo consistente en la familia de la histona H2A (H2AF), aldehído deshidrogenasa X (ALDH X), factor de alargamiento de la traducción eucariótica 2 (EEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión de EF-hand calcio (RCN2) y calponina 1 del músculo liso básica (CNN 1), más alto que el segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 15 35. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3 o 20, en donde dichas células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 isoforma a (Papss2) y proteína ribosomal L7a (rpL7a), más bajo que el segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 20 36. Los métodos, población de células o medio del apartado 1, 2, 3 o 20, en donde dichas células adherentes o medio se caracterizan por una actividad inmunosupresora más alta que la de células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
37. La población de células aislada del apartado 36, en donde dicha actividad inmunosupresora comprende la reducción de la proliferación de células T.
- 25 38. El método o población de células del apartado 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12 o 13, en donde dichas células comprenden células que tienen un fenotipo de células madre estromales.
39. El método del apartado 38, en donde dicho fenotipo de células madre estromales comprende la actividad de supresión de las células T.
40. El método del apartado 38, en donde dicho fenotipo de células madre estromales comprende la actividad de soporte de células madre hematopoyéticas.
- 30 41. El uso de la población de células del apartado 3, 4, 5, 6 o 7 para la elaboración de un medicamento identificado para trasplante.

REIVINDICACIONES

1. Células estromales adherentes de un tejido elegido entre el grupo que consiste en placenta y tejido adiposo para su uso en el tratamiento de

(a) una enfermedad o condición elegida entre el grupo que consiste en pérdida de sangre, anemia, trastornos autoinmunitarios, diabetes, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD), encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgen, miastenia gravis (MG), síndrome de Guillain-Barre (GBS), tiroiditis de Hashimoto (HT), enfermedad de Grave, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) y enfermedad intestinal inflamatoria; o

(b) una condición que puede beneficiarse de la facilitación del injerto de células madre hematopoyéticas en un sujeto,

en donde dichas células estromales adherentes se obtienen de un cultivo tridimensional.

2. Un medio acondicionado de células estromales adherentes derivadas de un tejido elegido entre el grupo que consiste en placenta y tejido adiposo, para su uso en el tratamiento de una condición elegida entre el grupo que consiste en trastornos autoinmunitarios, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), encefalitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgen, miastenia gravis (MG), síndrome de Guillain-Barre (GBS), toroiditis de Hashimoto (HT), enfermedad de Grave, diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM) y enfermedad intestinal inflamatoria,

en donde dichas células estromales adherentes se obtienen de un cultivo tridimensional.

3. Las células o el medio para el uso según las reivindicaciones 1ª o 2ª, que comprenden además administrar células madre.

4. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 3ª, en donde dichas células madre

- comprenden células madre hematopoyéticas, y/o
- se administran al mismo tiempo que dicho medio acondicionado o células adherentes, y/o
- se administran después de la administración de dichos medio acondicionado o células adherentes.

5. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 1ª, en donde dicho cultivo tridimensional comprende un biorreactor 3D.

6. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 5ª, en donde dicho biorreactor se elige entre el grupo que consiste en un biorreactor de flujo pistón, un biorreactor continuo de tanque agitado y un biorreactor de lecho estacionario.

7. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 1ª, en donde

- dicho cultivo de dichas células se realiza bajo un flujo continuo de un medio de cultivo y/o
- dicho cultivo tridimensional comprende un material adherente elegido entre el grupo que consiste en un poliéster, un polialquileño, un polifluorocloroetileno, un poli(cloruro de vinilo), un poliestireno, una polisulfona, un acetato de celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de matriz extracelular, un colágeno, un poli (ácido L láctico) y una fibra de metal inerte y/o
- dicho cultivo se realiza durante al menos 3 días y/o
- dicho cultivo se realiza hasta que dichas células adherentes alcanzan al menos un 60% de confluencia y/o
- dichas células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador positivo elegida entre el grupo que consiste en CD73, CD90, CD29 y CD105 y/o
- dichas células adherentes comprenden una matriz de expresión de marcador negativo elegido entre el grupo que consiste en CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79 y/o
- dichas células adherentes segregan un nivel de al menos un factor elegido entre el grupo que consiste en SCF, Flt-3 y IL-6 más elevado que el segregado por células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D y/o
- dichas células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína elegida entre el grupo que consiste en la familia de la histona H2A (H2AF), aldehído deshidrogenasa X (ALDH X), factor de alargamiento de la traducción eucariótica 2 (EEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión de EF-hand calcio (RCN2) y

calponina 1 del músculo liso básica (CNN1), más alto que el segregado por las células adherentes de placenta o tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D y/o

- 5 • dichas células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, 3 fosfoadenosina 5 fosfosulfato sintasa 2 isoforma a (Papss2) y proteína ribosomal L7a (rpL7a), más bajo que el expresado por las células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 10 8. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 1ª, en donde dichas células adherentes o medio se caracterizan por una actividad inmunosupresora más elevada que la de células adherentes de placenta o de tejido adiposo desarrolladas en un cultivo 2D.
- 15 9. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 8ª, en donde dicha actividad inmunosupresora comprende la reducción de la proliferación de las células T.
- 15 10. Las células o el medio para el uso según las reivindicaciones 1ª o 2ª, en donde dichas células comprenden células que tienen un fenotipo de células madre estromales.
- 15 11. Las células o el medio para el uso según la reivindicación 10ª, en donde dicho fenotipo de células madre estromales comprende la actividad de supresión de las células T y/o la actividad de soporte de las células madre hematopoiéticas.

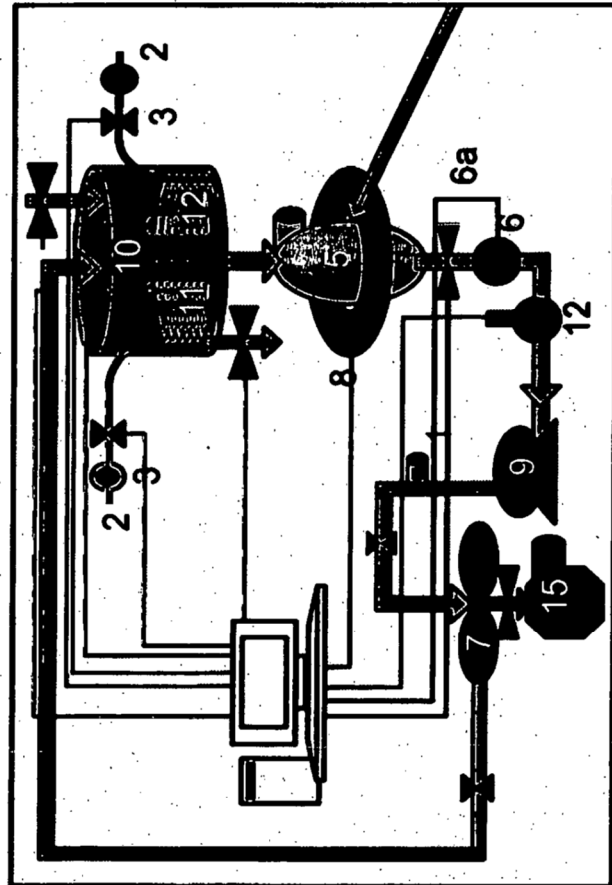
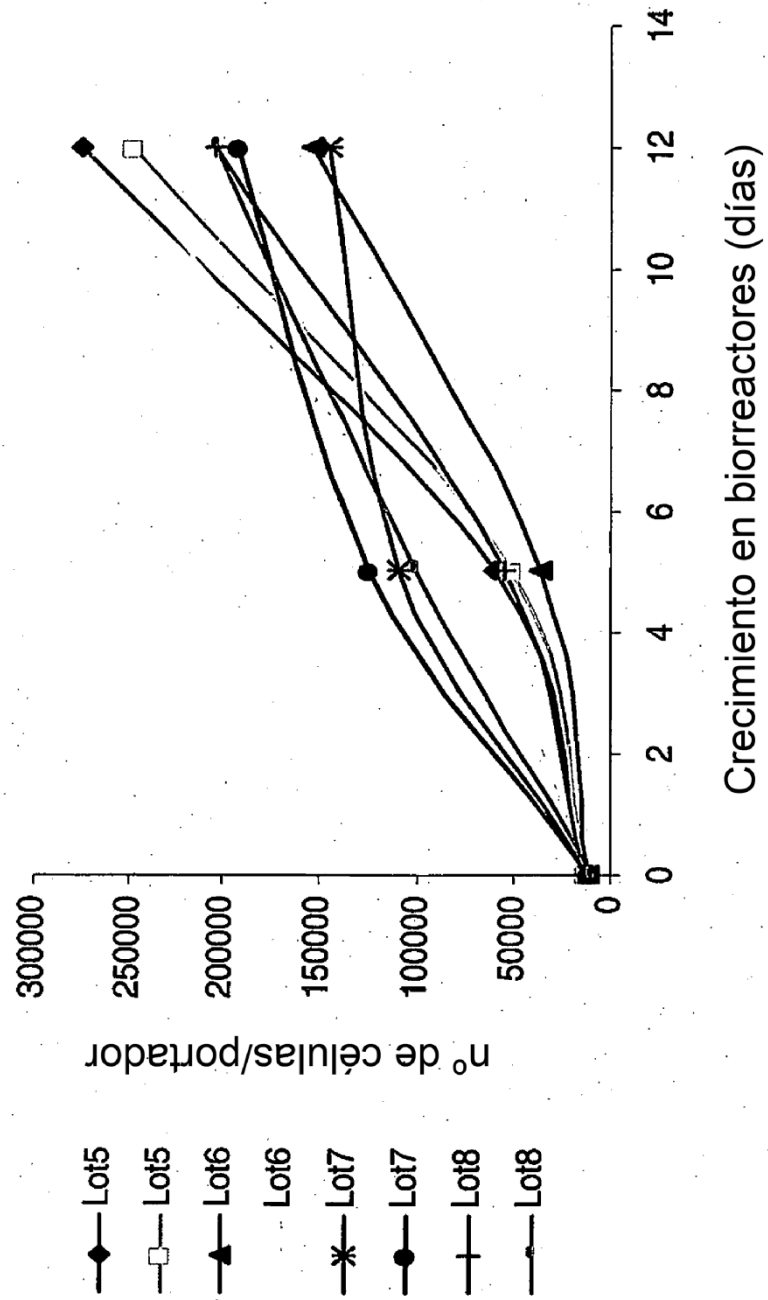


Fig. 2



Figs. 3a-b

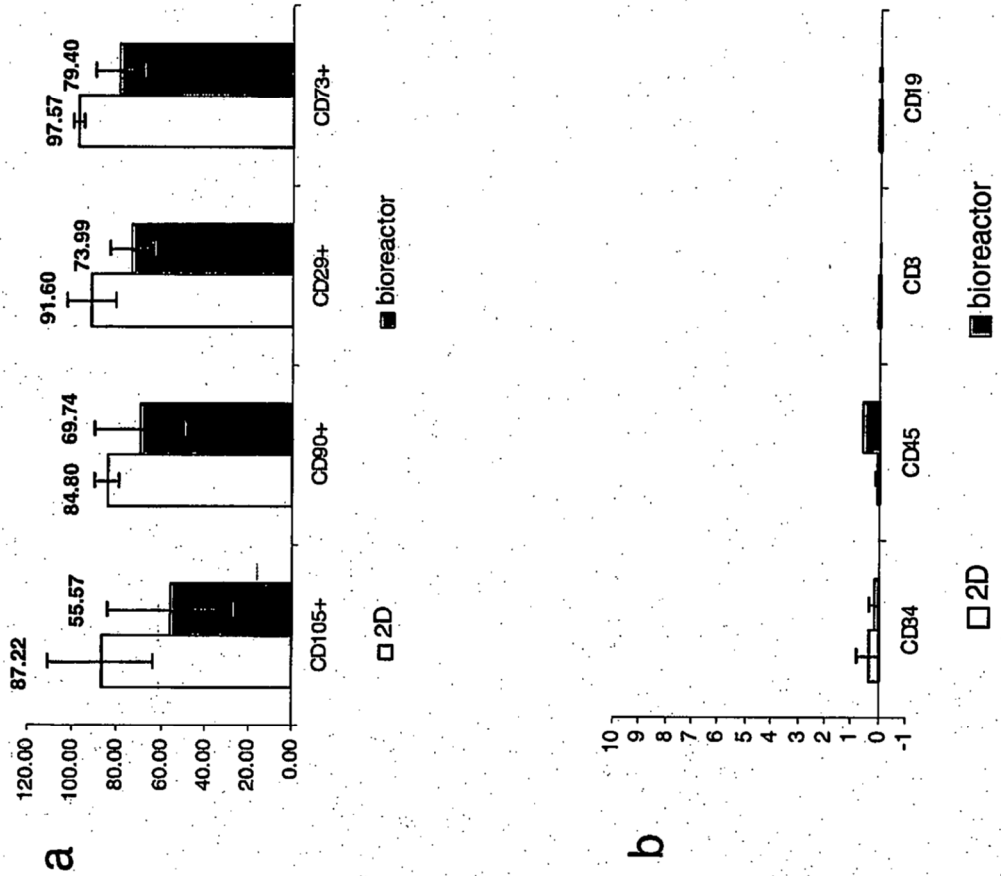


Fig. 4a

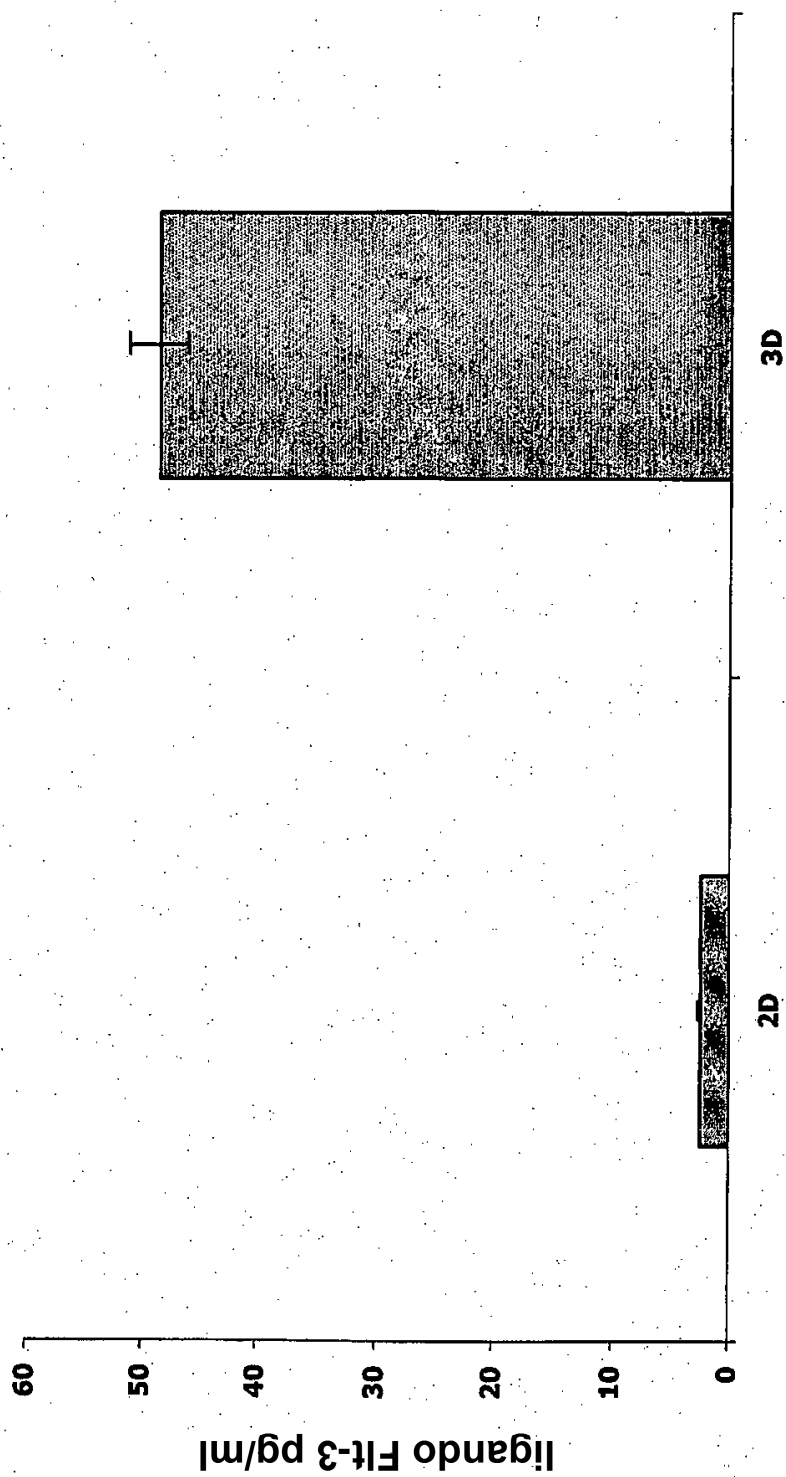


Fig. 4b

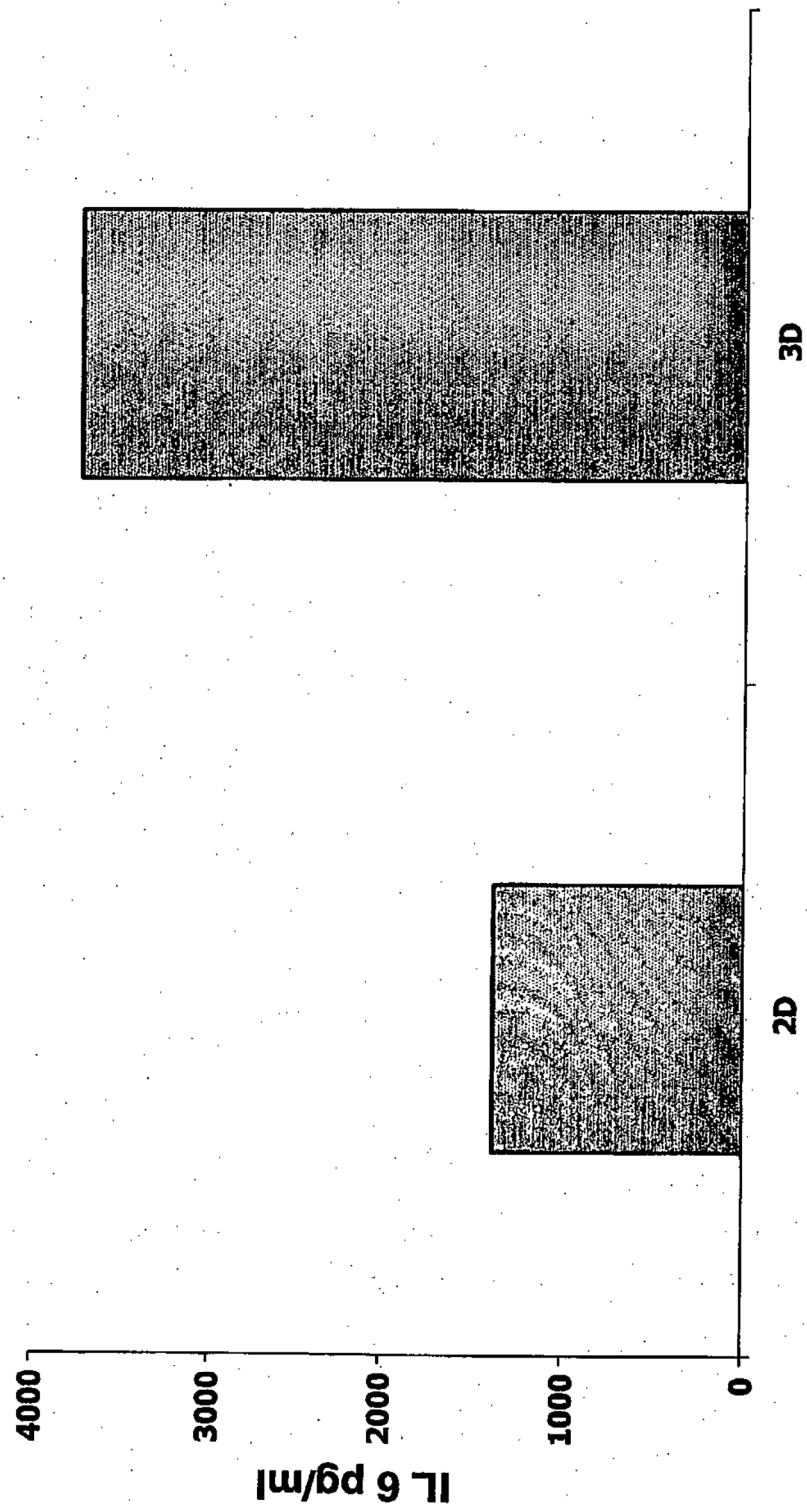
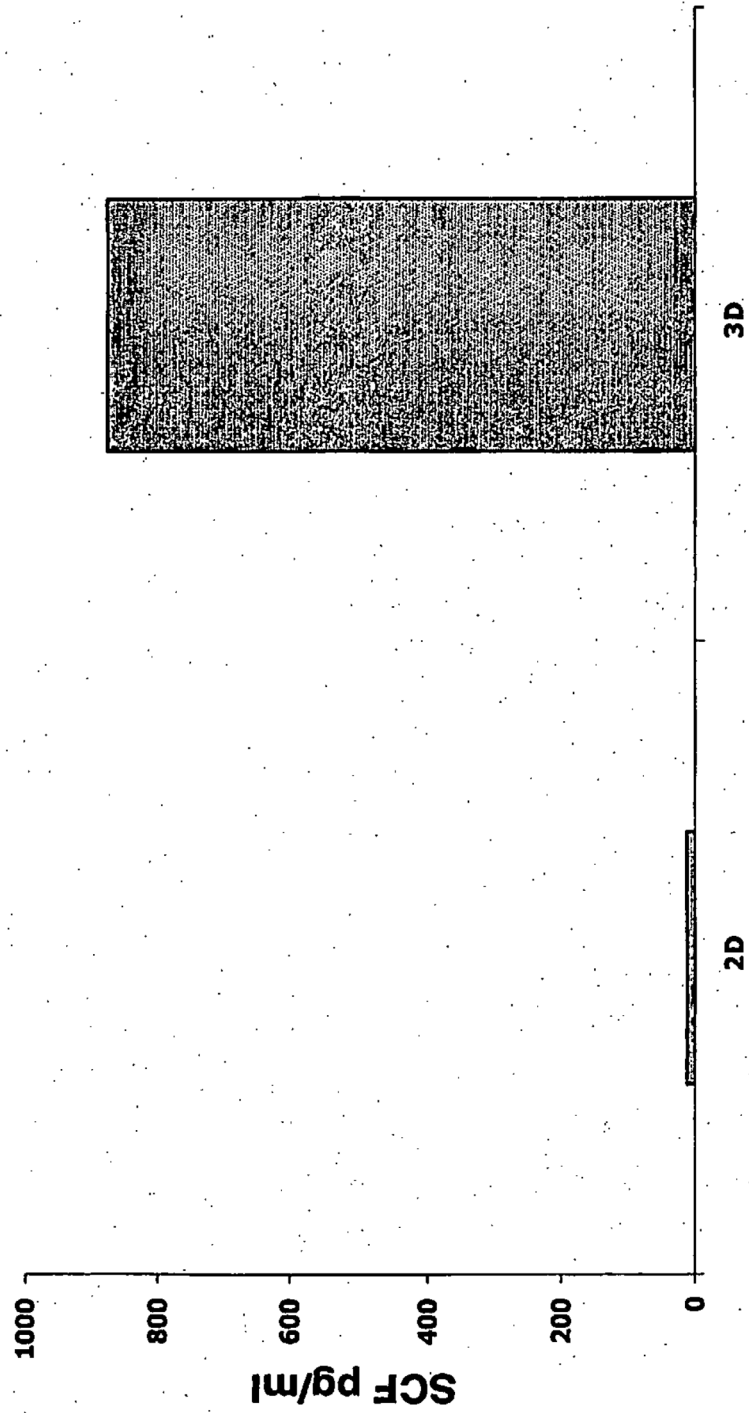
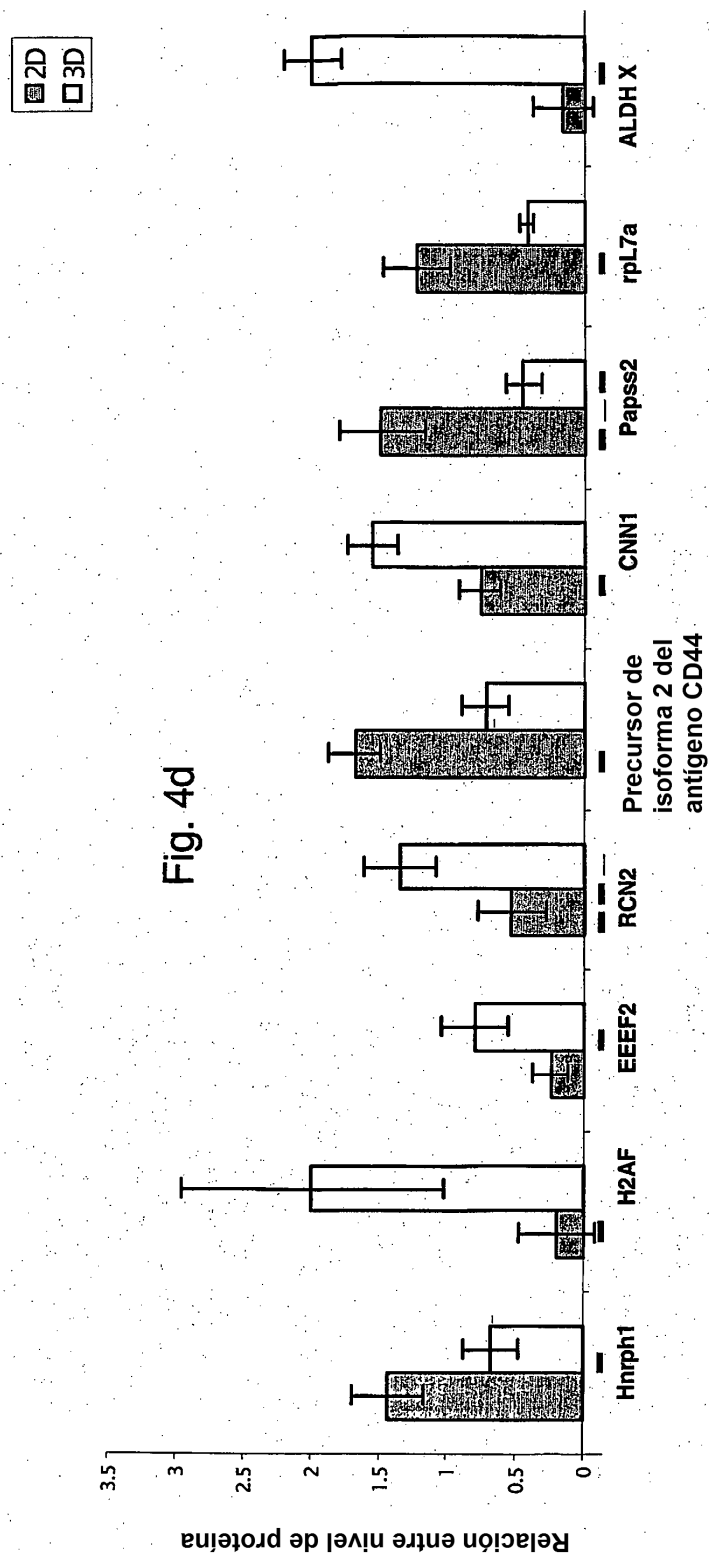


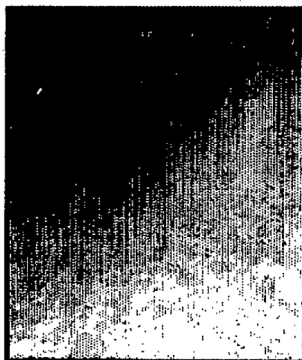
Fig. 4c



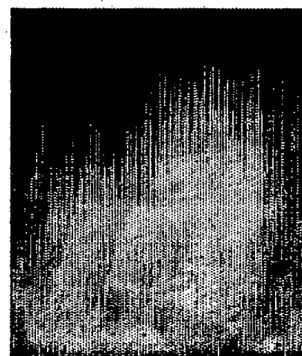


Figs. 5a-d

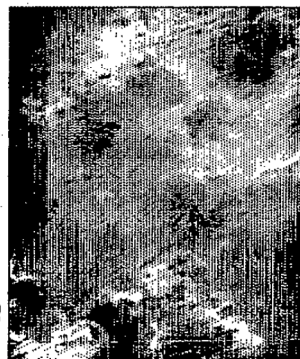
a



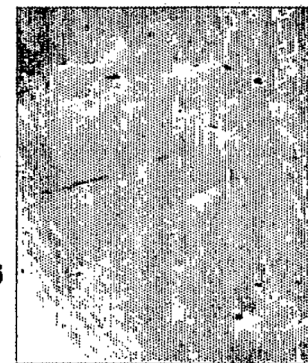
c



b



d



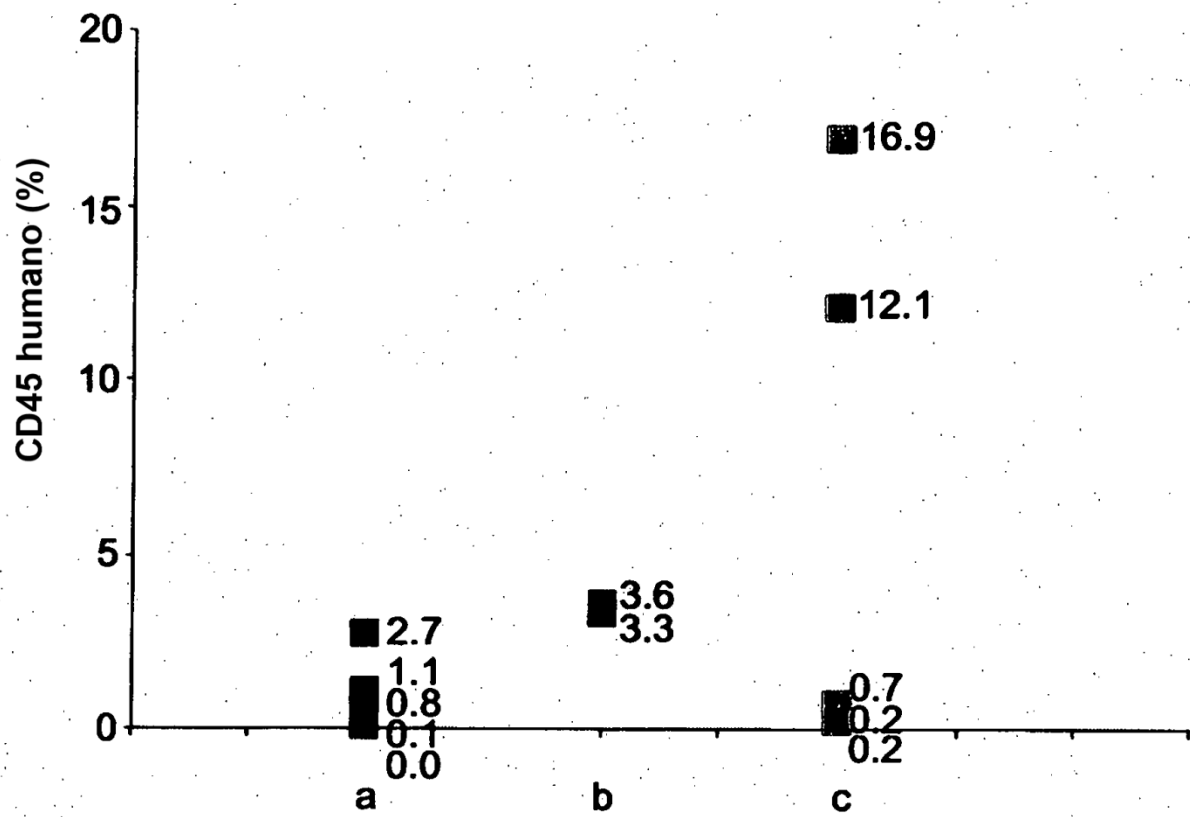
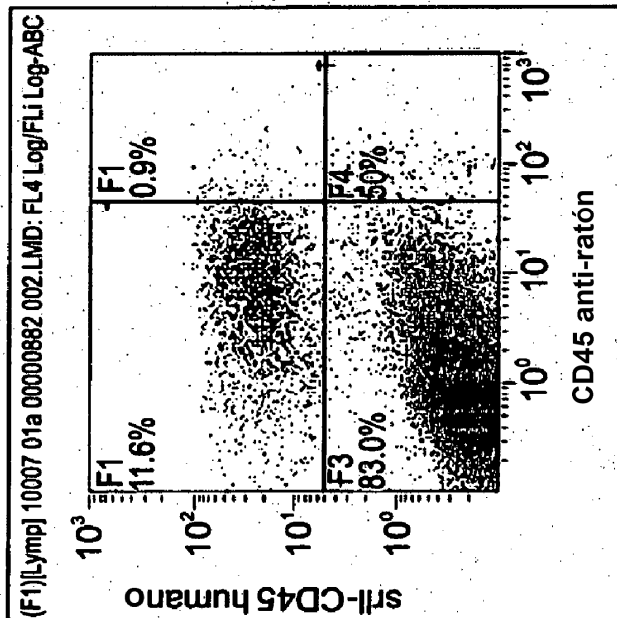


Fig. 6

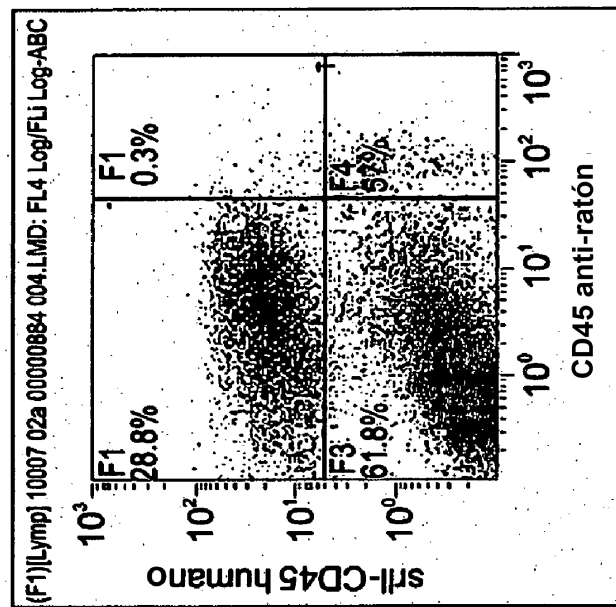


(F1)[Lymph] 10007 01a 00000882 002.LMD: Legend

Color	Name	% Gated	% Total	Number	Cells/μL
	anti-human CD45+	11.94	9.92	4961	ERROR
	anti-mouse CD45+	5.37	4.46	2229	ERROR
	lymp	100.00	83.08	41542	ERROR

Fig. 7a

CD45+ humano (%)
CD45+ de ratón (%)



(F1)[Lymph] 10007 02a 00000884 004.LMD: Legend

Color	Name	% Gated	% Total	Number	Cells/μL
	anti-human CD45+	29.23	4.81	12407	ERROR
	anti-mouse CD45+	9.42	7.99	3997	ERROR
	lymp	100.00	84.88	42441	ERROR

Fig. 7b

Fig. 8

