

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 214**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

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 12189046 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016** **EP 2548951**

54 Título: **Métodos para expansión celular y usos de células y medios acondicionados producidos de este modo 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:

30.05.2016

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 2 572 214 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 para expansión celular y usos de células y medios acondicionados producidos de este modo para terapia

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de expansión celular, poblaciones de células producidos de este modo y usos de los mismos. Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para expandir células adherentes de tejidos de placenta (a lo largo de todo el PCT) y usos terapéuticos de los mismos, tales como el trasplante de células madre hematopoyéticas.

10 En el mundo médico en desarrollo existe una creciente necesidad de células madre adultas en grandes cantidades para uso en injerto de células e ingeniería tisular. Además, la terapia con células madre adultas se encuentra en continuo desarrollo para tratar y curar diversas afecciones tales como trastornos hematopoyéticos, cardiopatía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, quemaduras, distrofia muscular, trastornos autoinmunitarios, diabetes y artritis.

15 Las células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) son células precursoras que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas tanto del linaje mielóide como del linaje linfóide. El agarre del injerto y el inicio de la hematopoyesis por HSC trasplantadas depende de la capacidad de estas células para asentarse y proliferar dentro de la médula ósea (MO) del receptor.

20 Es de aceptación general que las células madre están íntimamente asociadas in vivo con nichos discretos de la médula que proveen señales moleculares que intervienen colectivamente en su diferenciación y autorrenovación, a través de contactos célula-célula o de interacciones de corto alcance. Estos nichos forman parte del "microentorno inductivo hematopoyético" (HIM), compuesto por células de la médula, es decir, macrófagos, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales. Las células de la médula mantienen la integridad funcional del HIM al proporcionar proteínas de matriz extracelular (ECM) y componentes de la membrana basal que facilitan el contacto célula-célula. También proporcionan diversas citocinas solubles o residentes necesarias para la diferenciación y proliferación controladas de células hematopoyéticas.

25 Las interacciones entre las HSC y el estroma son necesarias para mantener la viabilidad de las HSC y evitar su diferenciación. Después del trasplante de HSC, las HSC trasplantadas deben asentarse en el microentorno de la médula ósea (MO) y alojarse en los nichos adecuados antes de que proliferen y se diferencien. Durante el proceso de asentamiento, las HSC trasplantadas abandonan el torrente sanguíneo y transmigran siguiendo un gradiente de quimiocinas a través de la barrera de células endoteliales de la MO para llegar a los nichos dedicados. A continuación, las HSC del donante deben asentarse en los nichos hematopoyéticos, donde encuentran un microentorno más favorable para la división de las HSC, y donde se puede establecer un continuo de contactos físicos y químicos entre las HSC y las células mesenquimales, la ECM y los factores de crecimiento secretados. Todos estos procesos implican un complejo abanico de moléculas, tales como citocinas, quimiocinas, hormonas, esteroides, proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas de interacción célula-célula, proteínas de adhesión y proteínas de matriz.

35 El número total de células injertadas en los nichos dedicados de la MO determina el éxito de un trasplante de HSC. Para conseguir el agarre del injerto, las HSC de donante que se trasplantan a la circulación sanguínea deben asentarse en la médula del receptor, donde generan focos funcionales de hematopoyesis. El número de estos focos se calcula como el producto del total de HSC transfundidas multiplicado por su eficacia de agarre del injerto.

40 Uno de los principales problemas relacionados con el trasplante de HSC es la escasa tasa de supervivencia de estas células en el sistema receptor. Está bien documentado que las HSC trasplantadas intravenosamente son retiradas de la circulación y se visualizan en la MO en el transcurso de algunos minutos después de su transfusión. Al cabo de tres a cinco horas desde el trasplante de HSC, no se detectan células de donante en la sangre periférica de los receptores [Askenasy et al. 2002 Transplanted hematopoietic cells seed in clusters in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells*. 20:301-10]. La gran mayoría de las células trasplantadas son destruidas al poco tiempo de haber sido transfundidas. En consecuencia, la colonización de la médula del receptor presenta una baja eficacia, y sólo 1-5% de las células transfundidas son detectadas en la MO del receptor a los 2-3 días tras el trasplante [Kerre et al. 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. 2002 2002 Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood*. 99:1585-93].

55 Las células estromales mesenquimales (MSC) son una población heterogénea de células, capaces de diferenciarse en diferentes tipos de células mesenquimales maduras. La diferenciación de estas células a células endoteliales reticulares, fibroblastos, adipocitos y células precursoras osteogénicas, depende de la influencia de diversos factores bioactivos.

El uso de MSC para apoyar el agarre del injerto de HSC es conocido en la técnica. Varias publicaciones han demostrado mayores eficacias de agarre de injerto de HSC cuando se cotrasplantan éstas con células madre

mesenquimales [Gurevitch et al. 1999 1999 Transplantation of allogeneic or xenogeneic 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 ha demostrado que el cotrasplante de células madre mesenquimales humanas en un modelo de injerto humano-ovino, produce la mejora del agarre de injerto a largo plazo de MO quimérica de HSC humanas en los animales [Almeida-Porada et al. 2000] Co-transplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in the circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation [*Blood. 95:3620-7*]. Se ha hallado que la inyección simultánea de HSC y células madre mesenquimales acelera la hematopoyesis [Zhang et al. 2004. *Stem Cells. 22:1256-62*]. Recientemente, estos hallazgos han sido extendidos a un modelo animal más cercano - el mono Rhesus. Cuando se cotrasplantaron HSC haplo-idénticas y células madre mesenquimales, se demostró un agarre facilitado del injerto de HSC [Liu et al. 2005 *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 26:385-8*]. También se ha informado recientemente del uso de células madre mesenquimales para favorecer el agarre del injerto de HSC en pacientes humanos [Koc ON, *J Clin Oncol. 2000;18:307-316*; Lazarus HM, *Biol Blood Marrow Transplant. 2005 May;11(5):389-98*].

Aparentemente, la contribución de las MSC al agarre de injertos hematopoyéticos reside en la producción de citocinas de apoyo a HSC que ayudan a mediar y equilibrar los potenciales de asentamiento, autorrenovación y compromiso de las HSC trasplantadas, en reconstruir el microentorno hematopoyético dañado que se necesita para el asentamiento y proliferación de las HSC y en la inhibición de las células T derivadas del donante, que pueden provocar enfermedad de injerto contra huésped (EICH), [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 ha encontrado que células madre mesenquimales humanas apoyan a células madre hematopoyéticas de donante no emparentado y suprimen la activación de células T en el modelo de ratón NOD-SCID, demostrando que MSC no emparentadas, derivadas de médula ósea humana, pueden mejorar el resultado de un trasplante alogénico.

Un obstáculo principal en el uso de las MSC reside en la dificultad para aislar grandes cantidades de poblaciones normalmente presentes de estas células, lo cual es técnicamente difícil y costoso debido en parte, a la limitada cantidad de células. La fuente más obvia de MSC es la médula ósea, pero la considerable incomodidad implicada en la obtención de aspirados de médula ósea y el riesgo de la biopsia constituyen inconvenientes de estos métodos. La creencia, ampliamente extendida, de que el embrión y el feto humanos representan una vida independiente hace al embrión humano una fuente problemática de células madre, añadiendo un aspecto religioso y ético a las dificultades logísticas ya existentes.

Se ha intentado recientemente hallar fuentes alternativas para obtener células madre. Tales fuentes alternativas son, por ejemplo, el tejido adiposo, los folículos pilosos, testículos, mucosa olfativa humana, saco vitelino embrionario, placenta, piel 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 para propósitos terapéuticos y de investigación todavía es limitada y generalmente laboriosa, que implica, por ejemplo, la recolección de células o tejidos de un paciente o sujeto donante, el cultivo y/o la propagación de células *in vitro*, disección, etc.

Se considera a la placenta como una de las fuentes más accesibles de células madre que no implica molestias o limitaciones éticas. Se ha encontrado que MSC derivadas de placenta tienen propiedades similares a las de MSC derivadas de MO. Son adherentes a plástico, expresan marcadores de membrana CD105, CD73 y CD90, y carecen de expresión de moléculas superficiales CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR. Sin embargo, a diferencia de las MSC derivadas de MO, las (PD)-MSC derivadas de placenta tratadas con interferón- γ regulan al alza HLA-DR en muy pequeña medida. Además, las células PD-MSC presentan propiedades inmunosupresoras que se intensifican en presencia de interferón- γ . (Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL. *Placenta-derived Multipotent Cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. Stem Cells. 2006 Nov;24(11):2466-77.*

Además de marcadores de MSC, las PD-MSC presentan característicos marcadores superficiales ESC de SSEA-4, TRA-1-61 y TRA-1-80, lo que sugiere que pueden ser células muy primitivas (Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. *Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells. 2005;23(1):3-9*). Además, las PD-MSC (origen fetal), pero no las MSC derivadas de MO son positivas para el antígeno-G leucocitario humano intracelular (HLA). ? (Chang CJ, Yen ML, Chen YC, Chien CC, Huang HI, Bai CH, Yen BL. *Placenta-derived multipotent cells exhibit immunosuppressive properties that are enhanced in the presence of interferon-gamma. Stem Cells. 2006 Nov; 24(11):2466-77.*)

Varios estudios han demostrado que el potencial de expansión de PD-MSC es significativamente mayor que el de MSC adultas derivadas de MO (Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, Shun CT, Yen ML, Lee MC, Chen YC. *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 or Maternal Origin from Human. Stem Cells, 2004;22:1338-1345.*) Además, las células adherentes derivadas de placenta pueden diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Al igual que en el caso de MSC derivadas de MO, se ha

hallado que MSC derivadas de placenta suprimen la proliferación de linfocitos de sangre de cordón umbilical (UCB, por sus siglas en inglés), lo que sugiere que un trasplante combinado de HSC y (PD)-MSC derivadas de placenta podría reducir la potencial enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en receptores [Li CD, et al., Cell Res. Jul.;15(7):539-47 (2005)] y podría reforzar el apoyo hematopoyético [ZhangYi et al., Chinese Medical Journal 117(6): 882-887 (2004)]. En el documento WO 00/73421, por ejemplo, se enseña el uso de la placenta como una fuente de células epiteliales amnióticas, pero la obtención de estas células requiere aún mucho trabajo y el rendimiento de las MSC es muy bajo.

Otra manera de resolver el problema de la cantidad limitada de MSC es la expansión ex-vivo de estas células utilizando diferentes condiciones de cultivo [véanse, por ejemplo, las 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 procedimientos específicos de selección y aislamiento arduos en tiempo que son necesarios y que hacen a estos métodos costosos y fastidiosos.

En varios estudios se ha hallado que el cultivo tridimensional (3D) de células es 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 MSC se basa en sembrar estas células en un biorreactor de perfusión que contiene espumas Polyactive [Wendt, D. et al., Biotechnol Bioeng 84: 205-214, (2003)] andamiajes porosos tubulares de poli(ácido L-láctico) (PLLA) en un biorreactor de perfusión de flujo radial [Kitagawa et al., Biotechnology and Bioengineering 93(5): 947-954 (2006)], y un biorreactor de flujo en pistón para el crecimiento y expansión de células madre hematopoyéticas (patente de EE.UU. nº 6,911,201).

En la patente de EE.UU. nº 6,022,743 se ha sugerido un armazón tridimensional que fija células estromales, y se ha sugerido la esponja de colágeno como matriz 3D en Hosseinkhani, H et al., [Tissue Engineering 11(9-10): 1476-1488 (2005)]. Sin embargo en ninguno de estos estudios se ha sugerido nunca el uso de MSC cultivadas en estas condiciones para apoyar el agarre de injertos in vivo de HSC después de un trasplante de HSC. Además, se requeriría la optimización, ardua en tiempo, de diversas condiciones, por ejemplo condiciones de perfusión, o de diversas técnicas de aislamiento para tipos celulares específicos.

En la patente de EE.UU. nº 7.045.148 y las solicitudes de patente de EE.UU. nos 20020123141, 20030032179 y 2005011871 se ha sugerido el uso de una placenta postparto perfundida como reactor 3D para el cultivo de MSC. Sin embargo, este procedimiento está limitado a un máximo de 24 horas desde el aislamiento de la placenta e implica perfusión, por lo que no es posible el crecimiento masivo de las células y su mantenimiento durante períodos de tiempo prolongados.

Existe por tanto una necesidad ampliamente reconocida de nuevos métodos para expansión celular y usos de células y medio acondicionado producidos de este modo para terapia, y que carezcan de las anteriores limitaciones, y resultaría sumamente ventajoso disponer de los mismos.

Compendio de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de expansión celular, comprendiendo el método cultivar células estromales adherentes a partir de tejido placentario en condiciones de cultivo tridimensional.

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

Según aún otro aspecto de la presente invención se proporciona una población de células generada según el método anterior.

Según otro aspecto más de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de tejido placentario, en donde las células adherentes secretan un nivel de al menos un factor seleccionado del grupo consistente en SCF, IL-6, y Flt-3 mayor que el secretado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de tejido placentario, en donde las células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en familia H2A (H2AF) de histonas, aldehidodeshidrogenasa X (ALDH X), factor 2 de alargamiento de traslación de eucariotas (EEEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión de calcio de mano EF (RCN2) y calponina 1 básica de músculo liso (CNN1) mayor que el expresado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.

Según aún un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de tejido placentario, en donde las células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrp1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, isoforma a de 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato sintasa 2

(Papss2) y proteína ribosómica L7a (rpL7a) menor que el expresado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.

5 Según un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona una población aislada de células que comprende células adherentes de tejido placentario, en donde las células adherentes están caracterizadas por una actividad inmunosupresora mayor que la de células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.

Según características adicionales de realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante la actividad inmunosupresora comprende reducción de la proliferación de células T.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, la población de células generada según el método precedente.

10 Según un aspecto adicional se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, el medio acondicionado producido según el método precedente.

Según aún un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un ingrediente activo, la población aislada de células según lo precedente.

15 Según aún un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para tratar una afección que se puede beneficiar el trasplante de células estromales en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células según lo anterior o la población de células generada según el método como anteriormente.

20 Según un aspecto adicional más se proporciona un método para tratar una afección que se pueda beneficiar del trasplante de células estromales en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un medio acondicionado de células adherentes derivado de un tejido seleccionado del grupo consistente en tejido placentario y tejido adiposo, tratando de ese modo la afección que se puede beneficiar del trasplante de células madre en el sujeto.

25 Según un aspecto adicional más se proporciona un método para reducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células según las reivindicaciones 3, 4, 5, 6 ó 7, para reducir la respuesta inmunitaria en el sujeto.

Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas se trata al sujeto con terapia celular.

Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el método comprende además administrar células madre.

30 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células madre comprenden células madre hematopoyéticas.

Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células son administradas a la vez que el medio acondicionado o células adherentes.

Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células son administradas después de la administración del medio acondicionado o células adherentes.

35 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes se obtienen de un cultivo tridimensional.

Según más características adicionales las células adherentes se obtienen de un cultivo bidimensional.

40 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la afección que se puede tratar con las células de placenta adherentes está seleccionada del grupo consistente en deficiencia de células madre, cardiopatía, enfermedad de Parkinson, cáncer, enfermedad de Alzheimer, apoplejía, quemaduras, pérdida de tejido, pérdida de sangre, anemia, trastornos autoinmunitarios, diabetes, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), trastornos neurodegenerativos, encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgen, esclerosis múltiple (EM), miastenia grave (MG), síndrome de Guillain-Barré (SGB), tiroiditis de Hashimoto (HT), enfermedad de Graves, diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI) y enfermedad inflamatoria intestinal.

45 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo tridimensional comprende un biorreactor 3D.

50 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el biorreactor está seleccionado del grupo consistente en un biorreactor de flujo en pistón, un biorreactor continuo de tanque agitado y un biorreactor de lecho estacionario.

- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo de las células se realiza bajo un flujo continuo de un medio de cultivo.
- 5 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo tridimensional comprende un material adherente seleccionado del 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 metálica inerte.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza durante al menos 3 días.
- 10 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza durante al menos 3 días.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el cultivo se realiza hasta que las células adherentes alcanzan al menos 60% de confluencia.
- 15 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la afección puede beneficiarse de la facilitación del agarre de injerto de células madre hematopoyéticas.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes comprenden un despliegue de expresión de marcadores positivos seleccionados del grupo consistente en CD73, CD90, CD29 y CD105.
- 20 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes comprenden un despliegue de expresión de marcadores negativos seleccionados del grupo consistente en CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34 y CD79.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes secretan un nivel de al menos un factor seleccionado del grupo consistente en SCF, Flt-3 e IL-6 mayor que el secretado por células adherentes procedentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.
- 25 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes expresan un nivel de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en familia H2A (H2AF) de histonas, aldehidodeshidrogenasa X (ALDH X), factor 2 de alargamiento de traslación de eucariotas (EEEEF2), reticulocalbina 3, dominio de unión de calcio de mano EF (RCN2) y calponina 1 básica de músculo liso (CNN1) mayor que el secretado por células adherentes procedentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.
- 30 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes expresan un nivel de expresión de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, isoforma a de 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato sintasa 2 (Paps2) y proteína ribosómica L7a (rpL7a) menor que el secretado por células adherentes procedentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.
- 35 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células adherentes o medio están caracterizados por una actividad inmunosupresora mayor que la de células adherentes procedentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la actividad inmunosupresora comprende reducción de la proliferación de células T.
- 40 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas las células comprenden células que tienen un fenotipo de célula madre estromal.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el fenotipo de célula madre estromal comprende actividad de supresión de células T.
- 45 Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el fenotipo de célula madre estromal comprende actividad de apoyo a células madre hematopoyéticas.
- Según más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el uso de la población de células descritas en lo que antecede es para fabricar un medicamento indicado para trasplante.
- 50 La presente invención supera con éxito los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas al proporcionar nuevos métodos de expansión celular y usos de células y medio acondicionado producido de este modo para terapia.
- Salvo que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria

5 tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, con inclusión de las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Breve descripción de las figuras

10 En la presente memoria se describe la invención, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específica a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas lo son sólo a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan con el objeto de proporcionar lo que se cree sea la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la Invención. A este respecto, no se pretende mostrar detalles estructurales de la invención con mayor detalle de lo necesario para una comprensión fundamental de la invención, y la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ser realizadas en la práctica las diversas formas de la invención.

15 En los dibujos:

20 Las Figuras 1a-g representan el microentorno similar al óseo creado en el sistema de biorreactor que contiene soportes 3-D. Las Figuras 1a-b son micrografías electrónicas que muestran la comparación del hueso natural (Figura 1a) y la estructura del soporte 3D PluriX™ 7 días después de la siembra con células estromales adherentes (3D-ASC), imitando el microentorno óseo (Figura 1b). Las Figuras 1c-f son micrografías electrónicas que muestran la matriz 3D PluriX™ sembrada con 3D-ASC, producidas a partir de médula ósea, 20 días (Figuras 1c-d, ampliadas 150 y 250 veces, respectivamente) y 40 días (Figuras 1e-f, ampliadas 350 y 500 veces, respectivamente) después de la siembra. La Figura 1g es un diagrama del biorreactor 3D de flujo en pistón Plurix con partes separadas definidas por números: depósito (1) de medio de cultivo, suministro (2) de mezcla gaseosa, filtro (3), punto (4) de inyección, columna (5) en la cual están colocados los soportes 3D, controlador (6) de flujo, válvula (6a) de flujo, recipiente separador (7), analizadores (8) de crecimiento celular; bomba peristáltica (9), punto de muestreo (10), electrodo (11) para medida de O₂ disuelto, electrodo (12) para medida de pH, sistema de control (13), medios de cultivo frescos (14), medios de cultivo usados (15).

30 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 cultivo 3D dentro de los sistemas de biorreactor. Se sembraron ASC (2×10^6) en el biorreactor a una densidad de 10.000 - 15.000 células por soporte. Después de un cultivo de 12 días, las 3D-ASC alcanzaron una densidad entre 150.000-250.000 células por soporte, es decir $22,5-37,5 \times 10^6$ en un biorreactor que contenga 150 soportes.

35 Las Figuras 3a-b son gráficos de barras que muestran la diferencia en los niveles de expresión de marcadores de membrana expresados en 3D-ASC derivadas de placenta (morado oscuro) en comparación con marcadores de membrana en células de placenta cultivadas en condiciones de cultivo 2D convencionales (morado claro). Se cultivaron células adherentes durante 4-6 semanas en frascos (2D) o bien durante 2 a 3 semanas en el sistema de biorreactor, sobre soportes de poliestireno (3D). Después de cosechadas desde los matraces o los soportes, se incubaron las células y se unieron a un panel de anticuerpos monoclonales (MAb) que reconocían marcadores de membrana característicos de MSC (Figura 3a) o bien de células hematopoyéticas (Figura 3b). Nótese la expresión significativamente mayor de marcadores de membrana de MSC en células cultivadas en 2D tal como se muestra para los marcadores de membrana CD90, CD105, CD73 y CD29, en comparación con los marcadores de membrana de MSC expresados en células adherentes cultivadas en 3D, en especial CD105, que mostró 56% de expresión en células cultivadas en 3D frente a 87% en las células cultivadas en 2D (Figura 3a). Ni las ASC de cultivo 2D ni las de cultivo 3D expresaron ningún marcador de membrana hematopoyético (Figura 3b).

45 Las Figuras 4a-d son gráficos de barras que muestran una comparación de niveles de proteína en ASC producidas a partir de placenta, cultivadas en condiciones 2D y 3D, o medios acondicionados de las mismas. Las Figuras 4a-c representan niveles de ligando Flt-3 (Figura 4a), IL-6 (Figura 4b) y SCF (Figura 4c) en pg/ml, normalizados a 1×10^6 células por ml, según análisis mediante ELISA, en los medios acondicionados de ACS 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 mediante espectrometría de masas con muestras de proteína marcadas con reactivos iTRAQ comparados entre las mismas. Las muestras de proteína fueron tomadas de ASC cultivadas en condiciones 2D (barras blancas) y 3D (barras grises). La Figura representa uno de dos experimentos duplicados. Nótese la diferencia en el nivel de expresión de algunas de las proteínas en células y medios acondicionados de condiciones de cultivo 2D y 3D.

55 Las Figuras 5a-d son micrografías que muestran la capacidad de diferenciación in vitro de 3D-ASC derivadas de placenta a osteoblastos. Se cultivaron ASC derivadas de placenta humana en un medio de inducción osteogénica (DMEM que contenía 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, indicada mediante tinción con Rojo de Alizarina S. Las Figuras 5c-d muestran células testigo, que no habían sido tratadas con

medio de inducción osteogénica y mantenían un fenotipo de tipo fibroblasto, sin presentar mineralización.

La Figura 6 es un gráfico que representa el porcentaje de células CD45+ humanas detectadas en médula ósea (MO) de ratones NOD-SCID, tratados con quimioterapia (inyecciones intraperitoneales de busulfano 25 mg/kg durante dos semanas consecutivas) 3,5 semanas después del trasplante. Se trasplantaron células CD34+ (100.000) purificadas procedentes de células mononucleares derivadas de sangre de cordón umbilical, solas (5 ratones, a) o bien cotrasplantadas con $0,5 \times 10^6$ células adherentes derivadas de placenta, cultivadas en condiciones 2D (2D-ASC; 2 ratones, b), o bien células adherentes derivadas de placenta cultivadas en condiciones 3D (3D-ASC), en el biorreactor PluriX™ (5 ratones, c). Después se extrajo MO de fémures y tibias de los ratones. Se detectaron células humanas en la MO mediante citometría de flujo. El porcentaje de células humanas que expresaban CD45 se determinó incubando células con CD45-FITC anti-humana. Nótese el porcentaje superior de células humanas (hCD45+) en la médula ósea de ratones cotrasplantados con 2D-ASC (b) y con 3D-ASC (c) en comparación con el porcentaje de células humanas en los ratones tratados con HSC solas (a). El mayor agarre de injerto observado en ratones tratados con células cultivadas 3D-ASC en comparación con ratones tratados con células cultivadas 2D-ASC indica una ventaja terapéutica mayor exclusiva de ASC cultivadas en 3D.

Las Figuras 7a-b son análisis FACS de células CD45+ de injerto humano en ratones trasplantados con células CD34+ solamente (Figura 7a) en comparación con células CD34+ junto con ACS derivadas de tejido adiposo (Figura 7b). Nótese el porcentaje significativamente mayor de población hematopoyética humana (hCD45+) (7a - 29%) en un ratón cotrasplantado con ASC derivadas de tejido adiposo en comparación con un ratón tratado con CD34+ humanas solamente (7b -12%).

La Figura 8 es un gráfico de barras que representa una reacción linfocitaria mixta realizada entre células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CB) humano, y cantidades iguales de células de cordón umbilical irradiadas (3.000 Rad) (iCB), monocitos derivados de sangre periférica humana (PBMC), ASC placentarias cultivadas en 2D (2D) o en 3D (3D), o una combinación de PBMC y ASC placentarias cultivadas en 2D y 3D (PBMC+2D y PBMC+3D). El tamaño de la población de células CB está representado por la captación de ³H-timidina (expresada en CPM) que se midió durante las últimas 18 horas de cultivo. La elevación de la proliferación estimulada de células CB indica una respuesta inmunitaria de mayor nivel. Nótese el nivel inferior de respuesta inmunitaria exhibido por células incubadas con células adherentes y, en particular, la reducción de la respuesta inmunitaria de CB frente a PBMC cuando se han coincubado con células adherentes. Se realizaron tres réplicas de cada reacción.

30 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de nuevos métodos de expansión celular y usos de células producidas mediante el mismo, para terapia relacionada con las células madre, injerto de células madre y soporte de HSC.

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

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, es de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser llevada a la práctica o realizarse de diversas formas. También, es de entender que la fraseología y terminología empleada en la presente memoria es para un fin descriptivo, y no debe ser contemplada como limitante.

En el mundo médico en desarrollo, existe una creciente necesidad de células madre, y más específicamente de células madre estromales (también denominadas "células madres mesenquimales") con fines clínicos y de investigación. Las MSC se utilizan para el apoyo al trasplante e injerto de HSC y también para curar un número creciente de afecciones, por ejemplo cardiopatías, deficiencias de MO, enfermedades relacionadas con las neuronas y afecciones que requieren el trasplante de órganos o tejidos.

Los obstáculos para el uso de células madre residen en la dificultad técnica de aislar grandes cantidades de poblaciones normalmente presentes de células madre o progenitoras, debido a la limitada cantidad de estas células en la mayoría de los tejidos, las molestias y el riesgo implicados en los procedimientos para la obtención de células madre, y la pérdida asociada de células B de memoria y células madre hematopoyéticas con los procedimientos actuales de cosecha. La obtención de células de un embrión humano añade un aspecto religioso y ético a las dificultades técnicas ya existentes.

Las fuentes alternativas para células madre derivadas de médula ósea incluyen tejidos adiposos y placenta. Sin embargo, no existen en la actualidad métodos para la expansión eficiente de células madre procedentes de tales tejidos.

Al reducir a la práctica la presente invención, los autores de la presente invención han descubierto que en condiciones de cultivo 3D se pueden propagar eficientemente células adherentes procedentes de tejido placentario o tejido adiposo. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que dichas células comprenden propiedades funcionales que son similares a las de las MSC y por tanto estas células y el medio

acondicionado producido de ese modo se pueden utilizar para fines terapéuticos tales como el trasplante, regeneración de tejido y apoyo a HSC in vivo.

5 Tal como se ilustra a continuación en la presente memoria y la sección de Ejemplos que sigue, los autores de la presente invención han sido capaces de expandir en configuraciones 3D células adherentes derivadas de tejido
 10 adiposo y placenta que comprenden propiedades de células madre estromales. Se halló que las células expandidas de esta manera son viables, una vez criopreservadas, como evidencian ensayos de adherencia y repoblación (véase el Ejemplo 1). El análisis por citometría de flujo de células adherentes derivadas de placenta descubrió un patrón de expresión de marcadores característico y (véanse las Figuras 3a-b), lo que es muy importante, que células adherentes derivadas de tejido adiposo y placenta propagadas en configuraciones 2D ó 3D fueron capaces de
 15 apoyar el agarre de injertos de HSC (véase el Ejemplo 2), corroborando el uso de las células de la presente invención, como células madre estromales, en la clínica.

Así, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método de expansión celular.

El método comprende cultivar células adherentes procedentes de tejido placentario en condiciones de cultivo tridimensionales (3D) que apoyan la expansión celular.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, los términos "expandir" y "expansión" se refieren al mantenimiento, sustancialmente sin diferenciación, de las células y en último extremo al crecimiento celular, es decir, el incremento de una población de células (por ejemplo, hasta al menos el doble) sin diferenciación que acompañe a tal incremento.

20 Tal como se emplea en la presente memoria, los términos "mantener" y "mantenimiento" se refieren a la renovación, sustancialmente sin diferenciación, de células, es decir, una población de células sustancialmente estacionaria sin diferenciación que acompañe a tal estacionalidad.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "células adherentes" se refiere a una población homogénea o heterogénea de células que son dependientes de anclaje, es decir, requieren unión a una superficie para crecer in vitro.

25 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "tejido adiposo" se refiere a un tejido conjuntivo que comprende células grasas (adipocitos).

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "tejido placentario" se refiere a cualquier porción del órgano femenino de los mamíferos que reviste la pared uterina y durante el embarazo envuelve al feto, al cual está unido por el cordón umbilical. Después del parto, la placenta es expulsada (y se la denomina placenta postparto).

30 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "condiciones de cultivo tridimensionales" se refiere a disponer las células en condiciones que sean compatibles con el crecimiento celular al tiempo que permitan a las células crecer en más de una capa. Es bien conocido que el entorno in situ de una célula en un organismo vivo (o un tejido) tiene una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas por otras células. Están sostenidas en una red compleja de fibras de matriz extracelular de escala nanométrica que permite el establecimiento de diversos
 35 microentornos locales. Sus ligandos extracelulares intervienen no sólo en la unión a la membrana basal sino también en el acceso a una diversidad de vasos vasculares y linfáticos. Se transportan a las células oxígeno, hormonas y nutrientes, y se evacúan los productos de desecho. Las condiciones de cultivo tridimensionales de la presente invención están diseñadas para imitar dicho
 40 ambiente tal como se ilustra con mayor detalle a continuación.

Así, las células adherentes de este aspecto de la presente invención se obtienen de tejido placentario.

Las células placentarias se pueden obtener de una placenta a término o pre-término. Preferiblemente, se toma la placenta una vez que ha dejado de sangrar. Preferiblemente se perfunde la placenta durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar células residuales. Los términos "perfundir" o "perfusión" que se emplean en la presente
 45 memoria se refieren al acto de hacer pasar o circular un fluido sobre o a través de un órgano o tejido. El tejido placentario puede proceder de cualquier mamífero; lo más preferiblemente, el tejido placentario es humano. Una placenta postparto (por ejemplo, de 1-6 horas) es una fuente conveniente de tejido placentario, aunque la fuente de tejido o células placentarias, o el método de aislamiento de tejido placentario, no son críticos para la invención.

Se pueden obtener células adherentes derivadas de placenta tanto de partes fetales (es decir, del amnión o partes internas de la placenta, véase el Ejemplo 1) como maternas (es decir, decidua basal y decidua parietal) de la placenta. Se lavan las muestras de tejido en un tampón fisiológico [por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) o tampón de Hank]. Se preparan suspensiones de células únicas tratando el
 50 tejido con una enzima digestiva (véase más adelante) o/y desmenuzando y lavando por arrastre las porciones de tejido a través de un filtro de nylon o bien por pipeteo suave (Falcon, Becton, Dickinson, San Jose, CA) con medio de lavado.
 55 lavado.

Las células adherentes derivadas de tejido adiposo se pueden aislar mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se describen tales métodos en la patente de EE.UU. n° 6,153,432. El tejido adiposo se puede extraer de sitios omentales/viscerales, mamarios, gonadales u otros sitios de tejido adiposo. Una fuente preferida de tejido adiposo es la adiposidad omental. En personas, el tejido adiposo se aísla típicamente mediante liposucción.

Se pueden derivar células adherentes aisladas de tejido adiposo tratando el tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones eficaces de hialuronidasa o ADNasa; y ácido etilendiaminotetraacético (AEDT); a temperaturas entre 25 - 50°C, durante períodos de tiempo entre 10 minutos a 3 horas. A continuación se pueden hacer pasar las células a través de un filtro de nylon o de gasa con una abertura de malla de entre 20 micrómetros a 800 micrómetros. Después se someten las células a centrifugación diferencial directamente en medios o bien a través de un gradiente de Ficoll o Percoll u otras partículas. Se centrifugan las células a velocidades de entre 100 - 3.000 x g durante períodos de tiempo entre 1 minuto a 1 hora, a temperaturas de entre 4 - 50°C (véase la patente de EE.UU. n° 7.078.230).

Además de células adherentes derivadas de tejido placentario o tejido adiposo, en la presente memoria se describe el uso de células adherentes procedentes de otras fuentes de células que se caracterizan por el fenotipo de célula madre estromal (como se describirá con mayor detalle más adelante en la presente memoria). Las fuentes tisulares de las cuales se pueden obtener células adherentes incluyen, sin limitación, sangre de cordón, 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, CT., et al., Histol Histopathol. 2006 Jun;21(6):633-43], fluido amniótico [Pieternella et al. (2004) Stem Cells 22:1338-1345], de todas las cuales se sabe que incluyen células madres mesenquimales. Se pueden aislar células adherentes de estas fuentes de tejido cultivando las células sobre una superficie adherente y aislando después las células adherentes de otras células de la población inicial.

Con independencia del origen (por ejemplo tejido placentario o tejido adiposo), la extracción de las células se realiza preferiblemente en condiciones estériles. Cuando se han obtenido células aisladas, se deja que se adhieran a un material adherente (por ejemplo, configurado como una superficie) para de este modo aislar células adherentes. Esto se puede realizar antes (véase el Ejemplo 1) o bien simultáneamente al cultivo en condiciones de cultivo 3D.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "un material adherente" se refiere a un material sintético, un material presente en la naturaleza, o una combinación de ambos, no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) que tiene una estructura química (por ejemplo, grupos cargados expuestos en la superficie) que puede retener las células sobre una superficie.

Los ejemplos de materiales adherentes que se pueden emplear según este aspecto de la presente invención incluyen, sin limitación, 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 (por ejemplo, fibronectina, condronectina, laminina), un colágeno, un poli(ácido L-láctico) y una fibra metálica inerte.

Se pueden realizar pasos adicionales de purificación o enriquecimiento de células madre estromales utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica (tales como FACS utilizando expresión de marcadores de células madres estromales, como se describirá con mayor detalle más adelante en la presente memoria).

Los ejemplos no limitantes de medios de base útiles en el cultivo según la presente invención incluyen medio mínimo esencial de Eagle, ADC-1, LPM (suero de bovino exento de albúmina), F10(HAM) F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con y sin modificación de Fitton-Jackson), medio basal de Eagle (BME - con adición de base salina de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - sin suero), Yamane, IMEM-20, modificación de Glasgow de medio de Eagle (GMEM), medio L-15 de Leibovitz, medio 5A de McCoy, medio M199 (M199E - con base salina de Earle), medio M199 (M199H - 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 esencial mínimo de Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre numerosos otros, que incluyen medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, G de Williams, Neuman & Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDDB 153. Un medio preferido para el uso en la presente invención es DMEM. Estos y otros medios útiles están disponibles de GIBCO, Grand Island, N.Y., EE.UU. y Biological Industries, Bet HaEmek, Israel, entre otros. Varios de estos medios están compendiados en *Methods in Enzymology*, volumen LVIII, "Cell Culture", páginas 62-72, compilado por William B. Jakoby e Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

Se puede suplementar el medio, por ejemplo, con suero tal como suero fetal de bovino o de otras especies y, de manera opcional o alternativa, factores de crecimiento, citocinas y hormonas (por ejemplo, hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor estimulante de colonias de macrófago, factor de ligando c-kit/célula madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factor de crecimiento similar a insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea, a concentraciones de

niveles entre picogram/ml y miligram/ml.

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

Una vez que se dispone de células adherentes se pueden traspasar a configuraciones tridimensionales (véase el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue). Se apreciará, sin embargo, que se pueden transferir las células a una matriz con configuración 3D inmediatamente después del aislamiento (como se ha mencionado más arriba en la presente memoria).

Así, se configura para cultivo en 3D el material adherente de este aspecto de la presente invención proporcionando de este modo una matriz para crecimiento que sustancialmente aumenta la superficie de unión disponible para la adherencia de las células estromales, con el fin de imitar la infraestructura del tejido (por ejemplo, la placenta).

Por ejemplo, para una matriz de crecimiento de 0,5 mm de altura se obtiene un incremento con 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, está referido a una capa unitaria, y si se utilizan una pluralidad de tales capas, ya sea apiladas o separadas mediante espaciadores o similares, el factor de 5 a 30 veces se aplica por cada una de tales estructuras. Cuando se utiliza la matriz en forma de lámina, preferiblemente láminas de fibras no tejidas, o láminas de polímeros en espuma con poros abiertos, el grosor preferido de la lámina es de aproximadamente 50 a 1.000 μm o más, procurándose una porosidad adecuada para la entrada de células, la entrada de nutrientes y la eliminación de productos de desecho fuera de la lámina. Según 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, siendo el espesor de fibra o diámetro de fibra preferido de aproximadamente 0,5 μm a 20 μm , y son aún más preferidas fibras dentro del intervalo de 10 μm a 15 μm de diámetro.

Las estructuras de la invención pueden estar suportadas por, o incluso mejor, unidas a láminas porosas o rejillas de soporte que proporcionen estabilidad dimensional y resistencia física.

Tales láminas de matriz también se pueden cortar, taladrar o desmenuzar para proporcionar partículas con una superficie de proyección del orden de aproximadamente 0,2 mm^2 hasta aproximadamente 10 mm^2 , y un grosor de mismo orden (aproximadamente de 50 a 1.000 μm).

En la patente de EE.UU. n° 5,168,085 y, en particular, en la n° 5,266,476 se describen más detalles referentes a la fabricación, uso y/o ventajas de la matriz de crecimiento que se ha utilizado para reducir a la práctica la presente invención.

La superficie adherente puede tener una forma seleccionada del grupo consistente en cuadrados, anillos, discos y cruces.

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

Los ejemplos de tales biorreactores incluyen, sin limitación, un biorreactor de flujo en pistón, un biorreactor continuo de tanque agitado y un biorreactor de lecho estacionario.

Tal como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, un biorreactor de flujo en pistón tridimensional (3D) (tal como el descrito en la patente de EE.UU. n° 6,911,201) es capaz de sostener el crecimiento y el mantenimiento prolongado de células estromales. En este biorreactor se siembran células estromales sobre soportes porosos hechos de una matriz de tela no tejida de poliéster, empaquetados en una columna de vidrio, permitiendo así la propagación de un gran número de células en un volumen relativamente pequeño.

La matriz utilizada en el biorreactor de flujo en pistón puede tener forma de lámina, láminas de fibras no tejidas o láminas de polímeros en espuma con poros abiertos, siendo el grosor preferido de la lámina de aproximadamente 50 a 1.000 μm o más, procurándose una porosidad adecuada para la entrada de células, la entrada de nutrientes y la eliminación de productos de desecho fuera de la lámina.

Otros biorreactores 3D que se pueden emplear con la presente invención incluyen, sin limitación, un biorreactor continuo de tanque agitado, en donde se alimenta de manera continua un medio de cultivo al biorreactor y se extrae de manera continua un producto, con el fin de mantener dentro del reactor un estado estacionario constante en el tiempo [está disponible un biorreactor con una cesta de lecho fibroso, por ejemplo de New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ], un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de levantamiento por aire, en donde típicamente se aporta aire al fondo de un tubo de tiro central que fluye hacia arriba al tiempo que forma burbujas, y separando gas de salida en la parte superior de la columna], un biorreactor de perfusión con siembra de células con espumas Polyactive [tal como se describe en Wendt, D. et al., *Biotechnol Bioeng* 84: 205-214, (2003)] andamiajes porosos tubulares de poli(ácido L-láctico) (PLLA) en un biorreactor de perfusión de flujo radial [tal como se describe en Kitagawa et al., *Biotechnology and Bioengineering* 93(5): 947-954 (2006)]. Otros biorreactores que se pueden

emplear de acuerdo con la presente invención se describen en las patentes de EE.UU. nº 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186.

La siembra con células se realiza preferiblemente a razón de 100.000-1.500.000 de células/mm en la siembra.

5 Preferiblemente, las células se cosechan cuando han alcanzado al menos aproximadamente 40% de confluencia, 60% de confluencia u 80% confluencia, al tiempo que preferiblemente se evitan la diferenciación incontrolada y la senescencia.

El cultivo se realiza durante al menos aproximadamente 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 20 días, un mes o incluso más tiempo. Se apreciará que el cultivo en un biorreactor puede prolongar este periodo. También se pueden realizar trasposos para aumentar el número de células.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, "un fenotipo de célula madre estromal" se refiere a un fenotipo estructural o funcional típico de una célula madre estromal (es decir, mesenquimal) derivada de médula ósea.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "célula madre" se refiere a una célula que no se ha diferenciado terminalmente.

Así, por ejemplo, las células pueden tener una forma ahusada. De manera alternativa o adicional, las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (por ejemplo marcadores de superficie) típicos de células madre estromales. Los ejemplos de marcadores de superficie de célula madre estromal (positivos y negativos) incluyen, sin limitación, CD105+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, CD80-, CD19-, CD5-, CD20-,
20 CD11B-, CD14-, CD19-, CD79-, HLA-DR- y FMC7-. Otro marcadores de célula madre estromal incluyen, sin limitación, tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

Los ejemplos de fenotipos funcionales típicos de células madre estromales incluyen, sin limitación, supresión de actividad de células T (no estimulan células T y, por el contrario, las inhiben), actividad de apoyo a células madre hematopoyéticas, y diferenciación adipogénica, hepatogénica, osteogénica y neurogénica.

25 Se puede utilizar cualquiera de estas características estructurales o funcionales para cualificar a 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 están caracterizadas por un perfil característico de expresión de proteínas, tal como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos. Así, por ejemplo, células adherentes de tejido placentario generadas de acuerdo con las presentes enseñanzas son capaces
30 de expresar y/o secretar altos niveles de factores seleccionados. Por ejemplo, tales células expresan o secretan SCF, Flt-3, H2AF o ALDH X al menos a un nivel 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o preferiblemente 12 veces mayor que el expresado o secretado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D. De manera adicional o alternativa, la población de células de la presente invención secreta o expresa IL-6, EEEF2, RCN2 o CNN1 a un nivel al menos 2, 3 o 5 veces mayor que el expresado o secretado por células adherentes de tejido placentario
35 cultivadas en un cultivo 2D. De manera adicional o alternativa, la población de células de la presente invención está caracterizada por un menor nivel de expresión de otras diversas proteínas en comparación con células cultivadas en 2D. Así, por ejemplo, secretan o expresan menos de 0,6, 0,5, 0,25 o 0,125 veces el nivel de expresión de Hnrph1, precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, Papss2 o rpL7a expresado o secretado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.

40 Al reducir adicionalmente a la práctica la presente invención, los autores de la misma han observado que células estromales adherentes, y en particular 3D-ASC, muestran actividad inmunosupresora. Como se muestra en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos que sigue, se ha hallado que células estromales adherentes, y en particular 3D-ASC, suprimen la reacción inmunitaria de células mononucleares de sangre de cordón umbilical humano en un ensayo MLR. Por tanto, las células de la presente invención pueden comprender actividades biológicas que se
45 pueden utilizar con preferencia en la clínica (por ejemplo, actividad de supresión de células T, actividad de apoyo a células madre hematopoyéticas).

Al reducir adicionalmente a la práctica la presente invención, los autores de la misma han observado que medio acondicionado de las células de la presente invención puede comprender actividades biológicas que se pueden utilizar con preferencia en la clínica (por ejemplo, actividad de supresión de células T, apoyo a células madre hematopoyéticas).
50

Así, la presente invención prevé además la recogida de medio acondicionado y su uso tal cual o bien después de pasos adicionales de concentración, enriquecimiento o fraccionamiento mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente un medio acondicionado de la presente se obtiene a partir de un cultivo de células mid-log de elevada viabilidad.

Tal como se ha mencionado más arriba en la presente memoria, las células y medios acondicionados de la presente invención se caracterizan por un fenotipo de célula madre estromal y se pueden utilizar, por tanto, en cualquier aplicación de investigación y clínica que pueda beneficiarse del uso de tales células.

5 El agarre del injerto y la iniciación de la hematopoyesis por HSC trasplantadas depende de procesos complejos que incluyen el asentamiento en la médula ósea, siguiendo un gradiente de quimiocinas a través de la barrera celular endotelial, y el alojamiento en los nichos adecuados, al tiempo que el establecimiento de contactos físicos entre células trasplantadas, la ECM y las células mesenquimales de los nichos. Todos estos procesos implican un complejo abanico de moléculas, tales como citocinas, hormonas, esteroides, proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas de interacción célula-célula y de adhesión, y proteínas de matriz.

10 Se sabe que al cabo de 2-3 días desde el trasplante, en la MO del receptor se detectan sólo 1-5% de las HSC transfundidas [Kerre et al., J Immunol. 167:3692-8. (2001); Jetmore et al., Blood. 99:1585-93 (2002)].

15 La contribución de las MSC al agarre de injertos hematopoyéticos consiste en parte en inhibir la producción de células T derivadas de donante, que provocan enfermedad de injerto contra huésped [EICH, 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); patentes de EE.UU. nos 6.010.696, 6.555.374]. y en parte en proporcionar apoyo a células madre hematopoyéticas (HSC) (es decir, sostener y ayudar a la proliferación, maduración y/o asentamiento de células madre hematopoyéticas).

20 Tal como se muestra en el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue, sorprendentemente se ha hallado que células adherentes derivadas de tejido placentario y tejido adiposo apoyan el agarre de injertos de HSC incluso después de quimioterapia.

Con estos resultados, resulta concebible que se puedan utilizar células o medios de la presente invención en cualquier aplicación clínica para la cual se utilice trasplante de células madre estromales.

25 Por tanto, según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar una afección médica (por ejemplo, patología, enfermedad, síndrome) que pueda beneficiarse del trasplante de células madre estromales en un sujeto que lo necesite.

30 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una patología y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden emplear diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una patología y, de manera análoga, se pueden emplear 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, y por ejemplo, sustancialmente elimina, los síntomas asociados a la afección médica.

35 Tal como se emplea en la presente memoria, "una afección médica que puede beneficiarse del trasplante de células madre estromales" se refiere a cualquier afección médica que puede ser aliviada mediante la administración de células/medios de la presente invención.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier sujeto (por ejemplo, un mamífero), preferiblemente un sujeto humano.

40 El método de este aspecto de la presente invención comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de las células o medios de la presente invención (descritos más arriba en la presente memoria), tratando de ese modo la afección médica que puede beneficiarse del trasplante de células madre estromales en el sujeto

45 Las células que se pueden administrar según este aspecto de la presente invención incluyen las células adherentes antes descritas que pueden estar cultivadas en configuraciones tridimensionales, así como derivados mesenquimales y no mesenquimales parcial o terminalmente diferenciados de las mismas.

En la técnica son bien conocidos métodos para derivar células específicas de linaje a partir de las células madre estromales de la presente invención. Véanse por ejemplo las patentes de EE.UU. Nos. 5.486.359, 5.942.225, 5.736.396, 5.908.784 y 5.902.741.

50 Las células pueden ser "naive" (no modificadas) o bien estar genéticamente modificadas con el fin de derivar un linaje de interés (véase la solicitud de patente de EE.UU. nº 20030219423).

Las células y medios pueden ser de fuente autóloga o no autóloga (es decir, alogénica o xenogénica) de preparaciones frescas o congeladas (por ejemplo, crio-conservadas).

Dependiendo de la afección médica, se pueden administrar al sujeto fármacos químicos adicionales (por ejemplo,

inmunomoduladores, quimioterapia, etc.) o células.

Así, por ejemplo, para mejorar el agarre de injertos de células madre (por ejemplo, incrementar el número de HSC viables en la MO del receptor y mejorar de manera óptima el recuento de glóbulos blancos normales) se pueden administrar las células/medios de la presente invención antes, simultáneamente o después del trasplante de HSC.

- 5 Preferiblemente, las HSC y las células estromales comparten antígenos HLA comunes. Preferiblemente, las HSC y las células estromales proceden de un único individuo. Como alternativa, las HSC y las células estromales proceden de individuos diferentes.

10 Los términos o expresiones "trasplante", "reemplazo celular" o "injerto" se usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a la introducción de las células de la presente invención en tejido diana. Las células se pueden derivar del receptor o bien de un donante alogénico o xenogénico.

Dado que es probable que células no autólogas induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al organismo, se han desarrollado diversas estrategias para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Dichas estrategias incluyen, o bien suprimir el sistema inmunitario del receptor, o bien encapsular antes del trasplante las células no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes.

- 15 Las técnicas de encapsulación se clasifican por lo general en microencapsulación, que implica pequeños vehículos esféricos, y macroencapsulación, que implica láminas planas de mayor tamaño y membranas de fibras huecas (Uludag, H. et al. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 42: 29-64).

20 Los métodos para preparar microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos por Lu MZ, et al., Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). *Biotechnol Bioeng.* 2000, 70: 479-83, Chang TM 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-cyanocinnamylideneacetate). *J Microencapsul.* 2000, 17: 245-51.

25 Por ejemplo, se preparan microcápsulas complejando colágeno modificado con una cáscara de ter-polímero de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico(MAA) y metacrilato de metilo (MMA), dando como resultado un espesor de cápsula de 2-5 μm . Tales microcápsulas pueden encapsularse adicionalmente con cáscaras adicionales de 2-5 μm de ter-polímero con el fin de proporcionar una superficie lisa negativamente cargada y minimizar la absorción de proteína plasmática (Chia, S.M. et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. *Biomaterials.* 2002 23: 849-56).

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

35 Se apreciará que la encapsulación de células se mejora cuando se emplean cápsulas más pequeñas. Así, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades in vitro de células encapsuladas mejoraron cuando se redujo el tamaño de la cápsula 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 ha hallado que biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado tan pequeño como 7 nm, químicas superficiales a medida y microarquitecturas precisas inmunoaislan con éxito microentornos para 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).

45 Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, sin limitación, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxicloloroquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (Remicade), etanercept, bloqueantes de TNF-alfa, un agente biológico que tiene como diana una citocina inflamatoria, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, sin limitación, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

50 En cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria, las células o medios se pueden administrar, o bien como tales, o bien, preferiblemente, como parte de una composición farmacéutica que contenga además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Tal como se emplea en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los conjugados químicos descritos en la presente memoria junto con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica consiste en facilitar la administración de un compuesto a un sujeto.

En lo que sigue, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no provocan una irritación significativa en un sujeto y no anulan la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Son ejemplos de vehículos, sin limitación, el propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua.

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

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

- 10 En "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, edición más reciente, se pueden encontrar técnicas para formulación y administración de fármacos.

Se puede administrar la composición farmacéutica de una manera sistémica (como se ha detallado más arriba). Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica localmente, por ejemplo mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

- 15 Las composiciones farmacéuticas de esta Invención se pueden fabricar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo mediante procedimientos convencionales de mezcladura, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización.

- 20 Así, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprendan excipientes y adyuvantes y que faciliten la elaboración de los ingredientes activos en preparaciones que se puedan utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

- 25 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. Para la administración transmucosal se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son en general conocidos en la técnica.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro y de cultivo celular. Preferiblemente, se formula una dosis en un modelo animal para conseguir una concentración o título deseado. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

- 30 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingrediente activos descritos en la presente memoria se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos habituales in vitro, en cultivos celulares o en animales de experimentación.

- 35 Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y en cultivos celulares y estudios en animales pueden ser utilizados para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. El facultativo concreto puede elegir la formulación, vía de administración y dosificación exactas a la vista del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", capítulo 1, página 1). Por ejemplo, se puede vigilar sintomáticamente a un paciente de Parkinson con respecto a funciones motoras mejoradas que indiquen una respuesta positiva al tratamiento.

- 40 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.

- 45 La cantidad y el intervalo de dosificación se puede ajustar individualmente a niveles del Ingrediente activo que sean suficientes para regular eficazmente la síntesis de neurotransmisores por las células implantadas. Las dosis necesarias para conseguir el efecto deseado dependerán de las características del individuo y de la vía de administración. Se pueden utilizar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la gravedad y grado de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede consistir en una sola o bien una pluralidad de administraciones, y el curso del tratamiento durar desde varios días a varias semanas o bien hasta que se logre la disminución del estado morbosos.

- 50 La cantidad a administrar de una composición dependerá, por supuesto, del individuo que está siendo tratado, de la gravedad de la afección, del modo de administración, del criterio del médico que prescribe, etc. La dosificación y posología de la administración responderán a una vigilancia cuidadosa y continua del estado cambiante del individuo. Por ejemplo, a un paciente de Parkinson en tratamiento se le administrará una cantidad de células que sea suficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad, basándose en los datos de la vigilancia.

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), de forma que se observa un efecto terapéutico.

También se pueden preparar composiciones que incluyan la preparación de la presente invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, disponerlas en un recipiente apropiado y etiquetarlas para el tratamiento de una afección que se indique.

Si se desea, se pueden presentar las composiciones de la presente invención en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase en blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede ir acompañado también de un aviso asociado al recipiente de una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o comercialización de productos farmacéuticos, aviso que refleje la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración en medicina humana o veterinaria. Tal aviso puede ser, por ejemplo, el etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de EE.UU. para fármacos con receta o un prospecto de producto aprobado.

Ejemplos

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

En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas están profusamente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III, compilado por Ausubel, R. M., (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 et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (compiladores) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías tales como las expuestas en las patentes de EE.UU. nos 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., (compilador) (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E. (compilador) (1994); Stites et al. (compiladores), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (compiladores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la literatura de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nos 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. (compilador) (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. I., (compiladores) (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" volúmenes 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo del presente documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos de la presente memoria son bien conocidos en la técnica y se ofrecen para conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Producción y cultivo de células estromales adherentes (ASC) a partir de médula ósea, tejido placentario y tejidos adiposos

Se cultivaron células adherentes en un sistema de biorreactor que contenía soportes 3D para producir células 3D-ASC, caracterizadas por un perfil específico de expresión de marcadores celulares. La eficacia del cultivo se evaluó mediante el recuento celular. Las capacidades de diferenciación de estas células se evaluó por cultivo en un medio de diferenciación.

Materiales y procedimientos experimentales

Células estromales de médula ósea - Se obtuvieron células estromales de médula ósea (MO) a partir de médula de esternón aspirada de donantes hematológicamente sanos sometidos a cirugía a corazón abierto o biopsia de MO. Se diluyeron los aspirados de médula a un tercio en solución de sales equilibrada de Hank (HBSS; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) y se sometieron a centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA). Posteriormente se recolectaron células mononucleares de médula ($<1,077 \text{ gm/cm}^3$), se lavaron 3 veces en HBSS y se resuspendieron en medios de cultivo [DMEM (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel) suplementado con FCS al 10% (GIBCO BRL), mercaptoetanol 10^{-4} M (Merck, White House Station, NJ), mezcla pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 $\mu\text{g/ml}$:1,25 un/ml; Beit Ha'Emek), L-glutamina 2 mM (Beit Ha'Emek)]. Se incubaron por separado células de donantes individuales en frascos de cultivo de tejidos (Corning,

Acton, MA) a 37°C (5% de CO₂) con cambio semanal de medio de cultivo. Se escindieron las células cada 3-4 días utilizando tripsina al 0,25% - EDTA (Beit Ha'Emek). Después de 2-40 traspasos, cuando habían alcanzado 60-80% de confluencia, se cosecharon las células para el análisis o para cultivo en biorreactores.

5 Células estromales derivadas de placenta - Se cortaron en condiciones estériles partes internas de una placenta de parto a término (Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel), 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. Louis, MO). Usando pipeteo suave, se lavaron luego las células suspendidas con DMEM suplementado con FCS al 10%, mezcla pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, se sembraron en frascos de 75 cm² y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo de tejidos en condiciones humidificadas, con 5% de CO₂. Después de esto, se permitió que las células se adhiriesen a una superficie de plástico durante 72 horas después de las cuales se cambiaron los medios cada 3 -4 días. Cuando se alcanzó el 60-80% de confluencia (generalmente 10-12 días), se separaron las células del frasco de cultivo utilizando tripsina al 0,25%-EDTA y se sembraron en frascos nuevos. Después se recolectaron las células cultivadas para su análisis o para el cultivo en biorreactores.

15 Células estromales derivadas de tejido adiposo - Se obtuvieron células estromales de tejido adiposo humano procedente de procedimientos de liposucción (Rambam Haifa, Israel). Se lavó abundantemente el tejido adiposo con volúmenes iguales de PBS y se digirió a 37°C durante 30 minutos con colagenasa (20 mg/ml). Después se lavaron las células con DMEM que contenía FCS al 10%, mezcla pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina y se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron con solución de lisis (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, con el fin de descartar glóbulos rojos sanguíneos), se centrifugaron y se resuspendieron con DMEM que contenía FCS al 10%, mezcla pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina. Después se sembraron las células lavadas en un frasco de medio estéril para cultivo de tejidos a razón de 3-10 x 10⁷ células/frasco. Al día siguiente se lavaron las células con PBS para eliminar los glóbulos rojos residuales y células muertas. Se mantuvieron las células a 37°C en un incubador para cultivo de tejidos en condiciones humidificadas, con 5% de CO₂. Se cambió el medio cada 3 a 4 días. Al llegar a 60-80% de confluencia, se desprendieron las células del frasco de cultivo utilizando tripsina al 0,25 %-EDTA y se sembraron en frascos nuevos. Después de 2-40 traspasos, cuando las células habían alcanzado 60-80% de confluencia, se cosecharon las células para análisis o para cultivo en biorreactores.

30 Biorreactor de flujo en pistón PluriX™ - Se cargó el biorreactor de flujo en pistón PluriX™ (Pluristem, Haifa, Israel; tal como se ilustra en la Figura 1g, véase también la patente de EE.UU. n° 6,911,201), con 1-100 ml de soportes porosos 3D empaquetados (de 4 mm de diámetro) hechos de una matriz de tela no tejida de poliéster. Estos soportes permiten la propagación de un gran número de células en un volumen relativamente pequeño. El material de vidrio fue diseñado y fabricado por Pluristem. El biorreactor fue mantenido en una incubadora a 37°C, con caudal regulado y controlado mediante una válvula (6a en la Figura 1 g) y bomba peristáltica (9 en la Figura 1g). El biorreactor tiene un punto (4 en la Figura 1g) de muestreo e inyección que permite la siembra secuencial de células. Se suministró medio de cultivo a pH 6,7-7,4 desde un depósito (1 en la Figura 1g). Se alimentó el depósito con una mezcla de gases filtrada (2,3 en la Figura 1g) que contenía aire/CO₂/O₂ en proporciones diversas, dependiendo de la densidad celular en el biorreactor. La proporción de O₂ era adecuada para el nivel de O₂ disuelto, a la salida del biorreactor, determinado mediante un monitor (6 en la Figura 1g). La mezcla gaseosa era suministrada al depósito a través de tubos o difusores de silicona (Degania Bet, Emek Hayarden, Israel). Se hizo pasar el medio de cultivo a través de un recipiente separador (7 en la Figura 1g) que permite la recogida de células no adherentes circulantes. La circulación del medio se consiguió mediante una bomba peristáltica (9 en la Figura 1g). El biorreactor estaba equipado además con un punto adicional de muestreo (10 en la Figura 1g) y recipientes para intercambio continuo de medio.

45 Producción de células estromales adherentes **3D (3D-ASC)** - Se tripsinizaron cultivos primarios de células humanas 2D adherentes no confluentes, cultivados como se ha descrito más arriba, se lavaron, se resuspendieron en DMEM suplementado con FBS al 10%, mezcla pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, y se sembraron (10³-10⁵ células/ml) a través de un punto de inyección sobre los soportes 3D en un biorreactor de flujo en pistón estéril (véase la Figura 1g). Antes de la inoculación se había llenado el biorreactor con PBS-Ca-Mg (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel), autoclavado (120°C, 30 minutos) y lavado con medio de crecimiento de Dulbecco que contenía suero fetal de bovino inactivado por calor, al 10%, y una mezcla de pen.-estrep.-nistatina (100 U/ml:100 µg/ml:1,25 un/ml). Se mantuvo el flujo a un caudal de 0,1-5 ml/minuto. El procedimiento de siembra implicaba el cese de la circulación durante 2-48 horas, lo que permitía que las células se asentasen en los soportes. Se mantuvo el biorreactor en condiciones controladas de temperatura (37°C) y pH (pH = 6,7-7,4); utilizando un incubador alimentado con aire estéril y CO₂, según fuera necesario. El medio de cultivo se reemplazaba 2-3 veces a la semana. El medio de circulación se reemplazaba por medio DMEM fresco a intervalos de 4 horas a 7 días. A una densidad de 1 x 10⁵-1 x 10⁷ células/ml (después de 12-40 días de cultivo), se extrajo del biorreactor el volumen total de medio y se lavaron los soportes 3-5 veces con PBS. Después se desprendieron células 3D-ASC de los soportes con tripsina-EDTA; (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel; 3-15 minutos con agitación suave, 1-5 veces), y a continuación se resuspendieron en DMEM y se crio-conservaron.

60 Ensayos biológicos de calidad de 3D-ASC - Se descongelaron células 3D-ASC crio-conservadas, y se contaron. Para evaluar la viabilidad celular, se sembraron 2 x 10⁵ células en un frasco para cultivo de tejidos de 150 cm² y se evaluó su capacidad de adherencia y repoblación en un plazo de 7 días después de la siembra. Después de ello, se

analizó el fenotipo 3D-ASC de marcadores de membrana utilizando citometría de flujo de anticuerpos monoclonales por fluorescencia (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

5 Comparación entre el perfil de marcadores de membrana celular de células adherentes cultivadas en 3D y 2D utilizando análisis de citometría de flujo - Se suspendieron 100.000-200.000 células adherentes procedentes de cultivos 2D y cultivos con sistema de flujo en 3D, en 0,1 ml de medio de cultivo en un tubo de 5 ml, y se incubaron (4°C, 30 minutos, condiciones oscuras) con concentraciones saturantes de cada uno de los siguientes MABs: CD90 anti-humano conjugado con FITC (Chemicon International Inc. Temecula, CA), CD73 anti-humano conjugado con PE (Bactlab Diagnostic, Cesarea, Israel), CD105 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 CD14 anti-humano conjugado con PE (IQProducts), CD11b anti-humano conjugado con FITC (IQProducts) y CD34 anti-humano conjugado con PE (IQProducts) o bien con MAb FILA-DR anti-humano conjugado con FITC (IQProducts). Después de la incubación se lavaron las células dos veces en PBS enfriada con hielo que contenía 1% de FCS inactivada por calor, se resuspendieron en 500 µl de formaldehído al 0,5% y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FC-500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

20 Comparación entre el perfil proteico de células adherentes cultivadas en 3D y 2D utilizando análisis por espectrometría de masas - Se produjeron ASC derivadas de placenta por procedimientos de cultivo en 2D y 3D tal como se ha descrito más arriba. En pocas palabras, los cultivos 2D se produjeron cultivando $0,3-0,75 \times 10^6$ células en frascos de 175 cm² durante 4 días bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C, hasta alcanzar 60 - 80% de confluencia. Los cultivos en 3D se produjeron sembrando $2-10 \times 10^6$ células/gramo en un biorreactor que contenía 2.000 soportes, y cultivando durante 18 días. Después de la cosecha, se lavaron las células (3 veces) para eliminar todo el suero, se formaron pellets y se congelaron. Se aislaron proteínas de los pellets utilizando el kit Tri Reagent (Sigma, Saint Louis, EE.UU.) y se digirieron con tripsina y se marcaron con reactivo iTRAQ (Applied Biosciences, Foster City, CA), según el protocolo del fabricante. En pocas palabras, los reactivos iTRAQ son reactivos no poliméricos para marcado isobárico. Se marcan péptidos dentro de cada muestra con una de cuatro marcas isobáricas, codificadas con isótopos, por medio de sus N-terminales y/o cadenas laterales de lisina. Se mezclan las cuatro muestras marcadas y se analizan los péptidos por espectrometría de masas. Tras la fragmentación del péptido, cada marca libera un ión informador de masa específico; la proporción entre los cuatro informadores proporciona por tanto las abundancias relativas del péptido dado en una muestra (información en: <http://docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/00113379.pdf>).

35 El análisis proteómico de ASC derivadas de placenta en cultivo 2D frente a cultivo 3D se realizó en el Smoler Proteomic Center (Department of Biology, Technion, Haifa, Israel) utilizando LC-MS/MS sobre QTOF-Premier (Waters, San Francisco, CA), con identificación y análisis realizados mediante software Pep-Miner [Beer, I., et al., Proteomics, 4, 950-60 (2004)] frente a la parte humana de la base de datos no. Las proteínas analizadas fueron: ribonucleoproteína H1 nuclear heterogénea (Hnrh1, número de accesión a GeneBank NP_005511), familia H2A de histonas (H2AF, número de accesión a GeneBank NP_034566.1), factor 2 de alargamiento de traslación de eucariotas (EEEE2, número de accesión a GeneBank NP_031933.1), reticulocalbina 3, dominio de unión de calcio de mano EF (RCN2, número de accesión a GeneBank NP_065701), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44 (número de accesión a GeneBank NP_001001389, calponina 1 básica de músculo liso (CNN1, número de accesión a GeneBank NP_001290), isoforma a de 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato sintasa 2 (Paps2, número de accesión a GeneBank NP_004661), proteína ribosómica L7a (rpL7a, número de accesión a GeneBank NP_000963) y aldehidodeshidrogenasa X (ALDH X, número de accesión a GeneBank P47738). Cada experimente se realizó dos veces. Debido a la naturaleza del análisis, se analizó cada proteína de acuerdo con el número de péptidos que aparecían en una muestra (2-20 apariciones de una proteína en cada análisis)

45 Comparación mediante ELISA entre proteínas secretadas en células adherentes cultivadas en 3D y 2D - Se obtuvieron como se ha descrito más arriba ASC derivadas de placenta, producidas mediante procedimientos de cultivo en 2D y 3D, con una duración de cultivos 3D de 24 días. Después se recogieron medios acondicionados y se analizaron en cuanto a ligando Flt-3, IL-6, trombopoyetina (TPO) y factor de células madre (SCF), empleando ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), en tres experimentos independientes. Se normalizaron los resultados para 1×10^6 células/ml.

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

Resultados

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

Para proporcionar condiciones de cultivo eficientes para células adherentes, se creó artificialmente un entorno similar al fisiológico (representado en la Figura 1a), utilizando el biorreactor PluriX (Pluristem, Haifa, Israel; el soporte

está ilustrado en la Figura 1g y se muestra antes de la siembra en la Figura 1b). Tal como se muestra en las Figuras 1c-f, se cultivaron con éxito células 3D-ASC producidas a partir de médula ósea y se expandieron sobre la matriz 3D durante 20 días (Figuras 1b-c, ampliadas 150 y 250 veces, respectivamente) y 40 días (Figuras 1c-d, ampliadas 350 y 500 veces, respectivamente) después de la siembra.

5 Las células cultivadas en el sistema de biorreactor PluriX se expandieron significativamente - Se cultivaron en los sistemas de biorreactor PluriX diferentes lotes de producción de células 3D-ASC derivadas de placenta. La densidad de siembra fue de 13.300 células/soporte (hasta un total de 2×10^6 células). Catorce días después de la siembra, la densidad celular se había multiplicado por 15, llegando a aproximadamente 200.000 células/soporte (Figura 2), o 30×10^5 en un biorreactor de 150 soportes. En un experimento diferente se sembraron células en el biorreactor a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/ml y 30 días después de la siembra los soportes contenían un número de células más de 50 veces superior, es decir aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células/soporte, ó $0,5 \times 10^7$ células/ml. La densidad celular de los soportes en los distintos niveles de la columna de crecimiento era consistente, lo que indica una transferencia homogénea de oxígeno y nutrientes a las células. El sistema de cultivo en 3D demostró, por tanto, proporcionar condiciones de apoyo para el crecimiento y mantenimiento prolongados de cultivos con alta densidad de células mesenquimales, que pudieron ser cultivadas de manera eficiente en una cantidad suficiente para los fines de apoyo a injerto y trasplante exitoso.

15 **Las 3D-ASC muestran características de marcador de membrana única** -- Para definir la diferencia en el perfil de secreción de moléculas solubles y producción proteica, efectuada mediante el procedimiento de cultivo 3D que imita el medio óseo, se efectuó el análisis FAC. Como se muestra en la Figure 3a, el análisis FACS de los marcadores celulares representa que 3D-ASC muestran un patrón de expresión de marcador diferente que las células adherentes cultivadas en condiciones 2D. Células cultivadas en 2D expresaron niveles significativamente mayores de marcadores de membrana CD90, CD105, CD73 y CD29 positivos en comparación con células cultivadas en 3D. Por ejemplo, el CD105 presentó una expresión de 56% en células cultivadas en 3D frente a 87% en células cultivadas en 2D. Ni las ASC de cultivos de placenta en 2D ni las de 3D expresaron ningún marcador de membrana hematopoyético (Figura 3b).

20 Las 3D-ASC muestran un perfil único de factores solubles - El nicho hematopoyético incluye células de apoyo que producen una abundancia de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Para definir adicionalmente la diferencia entre ASC cultivadas en 2D y 3D, se midió mediante ELISA el perfil de las cuatro principales proteínas hematopoyéticas secretadas a los medios acondicionados de los cultivos de ASC en 2D y 3D. Las Figuras 4a-c muestran que las células cultivadas en condiciones 3D produjeron medios acondicionados con mayores niveles de ligando Flt-3 (Figura 4A), IL-6 (Figura 4b) y SCF (Figura 4c), mientras que en los medios acondicionados de los cultivos 2D se detectaron bajos niveles de IL-6 y niveles cercanos a cero de ligando Flt-3 y SCF. La producción de trombopoyetina (TPO) era muy baja e igual en ambos cultivos.

30 Las 3D-ASC muestran un perfil de proteínas único en el análisis por espectrometría de masas - Para definir adicionalmente la diferencia entre ASC cultivadas en 2D y 3D, se analizó por espectrometría de masas el perfil proteico de estas células. La Figura 4d muestra que las ASC cultivadas en 2D y 3D presentan un perfil de expresión de proteínas notablemente diferente. Tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación, las células cultivadas en 3D muestran un nivel de expresión mucho mayor de H2AF y ALDH X (superior en más de 9 y 12 veces, respectivamente) y un nivel mayor de las proteínas EEEF2, RCN2 y CNN1 (aproximadamente 3, 2,5 y 2 veces, respectivamente). Además, las células cultivadas en 3D muestran aproximadamente la mitad de los niveles de expresión de las proteínas Hnrph1 y precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, y aproximadamente un tercio de los niveles de expresión de Paps2 y rpL7a.

Tabla 1

proteína	nivel de proteína (con relación al grupo informador iTRAQ)			
	ASC cultivadas		ASC cultivadas en 2D	
	media	desv. est.	media	desv. est.
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

proteína	nivel de proteína (con relación al grupo informador iTRAQ)			
	ASC cultivadas		ASC cultivadas en 2D	
precursor de isoforma 2 de 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

- 5 Las 3D-ASC tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos - Para caracterizar adicionalmente las 3D-ASC, se cultivaron células durante un periodo de 3 semanas en un medio de diferenciación de osteoblastos. Después de esto, se produjo la precipitación de calcio. Se demostró que células diferenciadas producían calcio (representado en rojo en las Figuras 5a-b) mientras que las células testigo mantuvieron un fenotipo de tipo fibroblasto y no presentaron mineralización (Figuras 5c-d). Estos resultados demuestran que las 3D-ASC derivadas de placenta tienen la capacidad de diferenciarse in vitro a células osteoblastos.

Ejemplo 2

Evaluación de la capacidad de 3D-ASC derivadas de placenta para mejorar el agarre de injertos de HSC

- 10 Se evaluó el apoyo de 3D-ASC al agarre de injertos de HSC por el nivel de células hematopoyéticas humanas (hCD45+) detectadas en ratones NOD-SCID inmunodeficientes irradiados de manera subletal o bien tratados previamente con quimioterapia.

Materiales y procedimientos experimentales

- 15 Aislamiento de células CD34+ - Se tomaron muestras de sangre de cordón umbilical en condiciones estériles durante el parto (Bnei Zion Medical Center, Haifa, Israel), se fraccionaron células mononucleares utilizando centrifugación en gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield PoC As, Oslo, Noruega) y se crio-conservaron. Se lavaron células mononucleares descongeladas y se incubaron con anticuerpos anti-CD34 y se aislaron utilizando 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).

- 20 Detección de células trasplantadas en ratones irradiados - Se mantuvieron en jaulas de sistema abierto, estériles, ratones NOD-SCID (NOD-CB17-Prkdcscid/J; Harlan/ Weizmann Inst., Rehovot Israel) machos y hembras, de siete semanas de edad, se les proporcionó dieta estéril y agua ácida autoclavada. Se irradió subletalmente (350 cGy) a los ratones y luego (48 horas después de la irradiación) se les trasplantaron 50.000-100.000 células hCD34+, con o sin ASC adicionales ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6) derivadas de tejido placentario o tejido adiposo (3-7 ratones en cada grupo),
 25 mediante inyección intravenosa en una vena caudal lateral. Transcurridas de cuatro a seis semanas desde el trasplante se sacrificaron los ratones por dislocación y se extrajo MO lavando ambos fémures y tibias con tampón FACS (50 ml de PBS, 5 ml de FBS, 0,5 ml de azida sódica al 5%). Se detectaron mediante citometría de flujo las células humanas en la MO de los ratones, y se determinó el porcentaje de las células humanas y murinas que expresaban el marcador de célula hematopoyética CD45, en los ratones NOD-SCID tratados, incubando células con
 30 CD45-FITC anti-humano (IQ Products, Groningen, Países Bajos). Se estableció en 0,5% el umbral más bajo para un agarre inequívoco de injerto humano.

- Detección de células trasplantadas en ratones tratados con quimioterapia** - Se inyectó intraperitonealmente busulfano (25 mg/kg durante 2 días consecutivos) a ratones NOD-SCID (NOD.CB17/JhkiHsd-scid; Harlan, Rehovot Israel) machos, de 6,5 semanas de edad, mantenidos como se ha descrito más arriba en la presente memoria para el caso de ratones irradiados. Dos días después de la segunda inyección de busulfano, se inyectaron a los ratones
 35 células CD34+ solas, o bien junto con $0,5 \times 10^6$ ASC producidas a partir de placenta. Se sacrificaron los ratones 3,5 semanas después del trasplante, y se determinó la presencia de células hematopoyéticas humanas tal como se ha descrito más arriba en la presente memoria para el caso de ratones irradiados.

Resultados

- 40 Las 3D-ASC mejoraron el agarre de injertos de HSC en ratones irradiados - Se cotrasplantaron células hematopoyéticas CD34+ humanas y 3D-ASC derivadas de tejido placentario o tejido adiposo, a ratones NOD-SCID

irradiados. Se evaluó la eficacia de agarre de injerto 4 semanas después del cotrasplante, y se comparó con ratones trasplantados sólo con HSC. Tal como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 6, el c-trasplante de 3D-ASC y células UCB CD34+ proporcionó tasas de agarre de injerto considerablemente superiores y mayores niveles de células humanas en la MO de ratones receptores, en comparación con ratones tratados sólo con células UCB CD34+.

5 **Tabla 2**

Células trasplantadas	h-CD45 promedio	Desv. est.
CD34	3,8	7,9
CD34 + 3D-ASC de placenta	5,1	12,2
CD34 + 3D-ASC de tejido adiposo	8,7	9,6

10 Las 3D-ASC mejoraron el agarre de injertos de HSC en ratones tratados con quimioterapia - Se cotrasplantaron células hematopoyéticas CD34+ humanas con 500.000 2D-ASC ó 3D-ASC derivadas de placenta, a ratones NOD-SCID pretratados con quimioterapia. Se evaluó la eficacia de agarre del injerto 3,5 semanas después del cotrasplante, y se comparó con ratones trasplantados sólo con HSC. Tal como se muestra en la Tabla 3, el cotrasplante de ASC y células UCB CD34+ proporcionó niveles de agarre de injerto superiores en la MO de los ratones receptores, en comparación con células UCB CD34+ solas. Además, tal como se muestra en la Tabla 3, el nivel medio de agarre de injerto fue superior en ratones cotrasplantados con células adherentes derivadas de placenta, cultivadas en el sistema de biorreactor PluriX (3D-ASC) que en los ratones cotrasplantados con células procedentes del mismo donante, cultivadas en las condiciones de cultivo estático 2D convencional (frasco).

15 **Tabla 3**

Células trasplantadas	h-CD45 promedio	Desv. est.
CD34	0,9	1,1
CD34 + cultivos 2D convencionales de placenta	3,5	0,2
CD34 + 3D-ASC de placenta	6,0	7,9

20 Los resultados de los análisis FACS que se muestran en las Figuras 7a-b demuestran la ventaja de cotrasplantar ASC junto con hHSC (Figura 7b), y la capacidad de las ASC para mejorar la recuperación del sistema hematopoyético después del trasplante de HSC.

25 Considerados conjuntamente, estos resultados demuestran que las ASC pueden servir como células de apoyo para mejorar la recuperación hematopoyética después del trasplante de HSC (autólogo o alogénico). La capacidad de las 3D-ASC para reforzar el agarre del injerto de células madre y/o progenitoras hematopoyéticas después del trasplante con HSC puede provenir de la capacidad de las 3D-ASC para secretar citocinas de apoyo a HSC que pueden mejorar la capacidad de asentamiento, autorrenovación y proliferación de las células trasplantadas, o bien de la capacidad de dichas células para reconstruir el microentorno hematopoyético dañado, necesario para el asentamiento y proliferación de las HSC trasplantables

Ejemplo 3

La supresión de respuesta linfocitaria por ASC cultivadas en 2D y 3D

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

Materiales y procedimientos experimentales

35 Ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) - Las propiedades inmunosupresoras e inmunoprivilegiadas de ASC derivadas de procedimientos de cultivo en 2D y 3D producidas a partir de placenta se determinaron mediante el ensayo MLR, que mide la histocompatibilidad en el locus HLA, calculada como la tasa de proliferación de linfocitos incompatibles en el cultivo mixto de células responsivas (proliferativas) y estimulantes (no proliferativas). Se emplearon células (2×10^5) mononucleares de sangre de cordón (CB, por sus siglas en inglés) humano como

5 células responsivas y se estimularon mediante cocultivo con cantidades iguales (10^5) de monocitos derivados de sangre periférica (PBMC) humana irradiados (3.000 Rad), o bien con células adherentes cultivadas en 2D ó 3D, producidas a partir de placenta, o con una combinación de células adherentes y PBMC. Cada ensayo se repitió tres veces. Las células fueron cocultivadas durante 4 días en medio RPMI 1640 (que contenía 20% de FBS bajo una atmósfera humidificada, con 5% de CO_2 a 37°C), en una placa de 96 pocillos. Se sometieron las placas a pulsos con $1 \mu\text{C}$ de ^3H -timidina durante las últimas 18 horas de cultivo. Después se cosecharon las células sobre un filtro de fibra de vidrio y se cuantificó la captación de timidina con un contador de centelleo.

Resultados

10 La Figura 8 muestra la respuesta inmunitaria de células CB, representada por la elevada proliferación de estas células cuando se las estimuló con PBMC, lo cual, sin quedar atados por la teoría, está probablemente asociado con la proliferación de células T en respuesta a la incompatibilidad de HLA. Sin embargo, estas células mostraron un nivel considerablemente menor de respuesta inmunitaria cuando se las incubó con las células adherentes de la presente invención. Además, la respuesta inmunitaria de CB a los PBMC se redujo sustancialmente cuando fueron coincubados con estas células adherentes. Por tanto, de una manera similar a las MSC, se encontró que las ASC
15 poseen la capacidad potencial de disminuir la proliferación de células T de células de donante, típica de la EICH. Aunque ambos cultivos, 2D y 3D, disminuyeron la respuesta inmunitaria de los linfocitos, en línea con las otras ventajas de las 3D-ASC descritas más arriba en la presente memoria, las 3D-ASC fueron más inmunosupresoras.

20 Se entenderá que algunas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proveerse combinadas en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proveerse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

25 Aunque se ha descrito la invención en conjunción con realizaciones específicas de la misma, es obvio que resultarán evidentes para los expertos en la técnica muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe tomarse como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior para la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de expansión celular, que comprende cultivar células estromales adherentes de tejido placentario en condiciones de cultivo tridimensionales.
2. El método de la reivindicación 1,
 - 5 a) en donde el sistema de cultivo tridimensional comprende un biorreactor tridimensional; y/o
 - b) en donde las células adherentes se cultivan hasta al menos 60% de confluencia; y/o
 - c) que además comprende aislar dichas células adherentes usando una enzima digestiva tal como colagenasa; y/o
 - d) en donde dichas condiciones de cultivo tridimensionales comprenden un biorreactor seleccionado del grupo que consiste en biorreactor de flujo en pistón, un biorreactor continuo de tanque agitado y un biorreactor de lecho
 - 10 estacionario; y/o
 - e) en donde dicha población de células estromales adherentes se obtiene de partes de la placenta seleccionadas del grupo que consiste en amnión, decidua basal y decidua parietal.
3. Una población aislada de células que comprende células estromales adherentes de tejido placentario cultivado en un cultivo tridimensional, en donde dichas células adherentes
 - 15 a) secretan un nivel elevado de al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en SCF, IL-6, y Flt-3 que el secretado por las células adherentes de tejido placentario cultivado en un medio 2D; y/o
 - b) expresan un nivel mayor de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en familia H2A (H2AF) de histonas, aldehidodeshidrogenasa X (ALDH X), factor 2 de alargamiento de traslación de eucariotas (EEEE2), reticulocalbina 3, dominio de unión de calcio de mano EF (RCN2) y calponina 1 básica de músculo liso (CNN1) que
 - 20 el expresado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D; y/o
 - c) expresan un nivel menor de al menos una proteína seleccionada del grupo consistente en ribonucleoproteína nuclear heterogénea H1 (Hnrph1), precursor de isoforma 2 de antígeno CD44, isoforma a de 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato sintasa 2 (Papss2) y proteína ribosómica L7a (rpL7a) que el expresado por células adherentes de tejido placentario cultivadas en un cultivo 2D.; y/o
 - 25 d) se generan según el método de las reivindicaciones 1 ó 2.
4. La población de la reivindicación 3, en donde las células suprimen una reacción inmune.
5. La población de la reivindicación 4, en donde dicha supresión comprende la reducción de la proliferación de células T.
6. Una composición farmacéutica que comprende la población de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, y un
 - 30 vehículo farmacéuticamente aceptable.
 7. La población de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 o la composición de la reivindicación 6 para uso en terapia.
 - 8.- La población de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 o la composición de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de pérdida de sangre, anemia, trastornos autoinmunitarios, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), encefalomiелitis autoinmunitaria (EAE), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjorgen, miastenia grave (MG), síndrome de Guillain-Barré (SGB), tiroiditis de Hashimoto (HT), enfermedad de Graves o enfermedad inflamatoria intestinal.
 9. La población o composición para el uso de las reivindicaciones 7 u 8,
 - 40 a) que además comprende administrar células madre al sujeto; opcionalmente en donde dichas células madre comprenden células madre hematopoyéticas; y/o
 - b) en donde las células adherentes expresan uno o más de CD73, CD90, CD29, o CD105; y/o
 - c) en donde las células adherentes no expresan CD45, CD80, HLA-DR, CD11b, CD14, CD19, CD34, o CD79.



Fig. 1a Fig. 1b Fig. 1c Fig. 1d Fig. 1e Fig. 1f

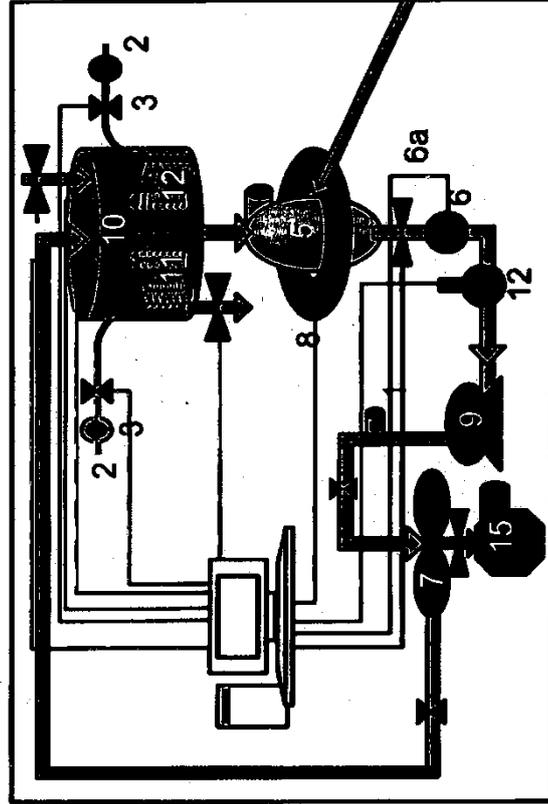
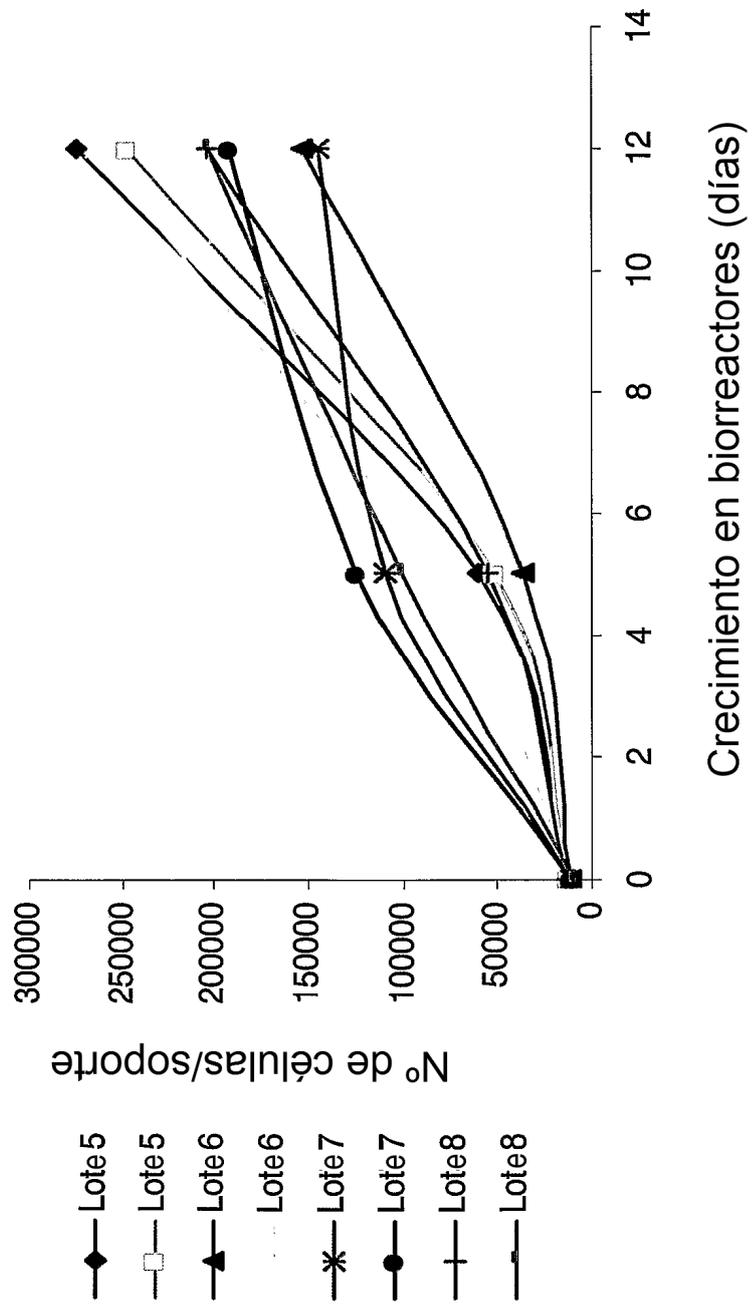


Fig. 19

Fig. 2



Figs. 3a-b

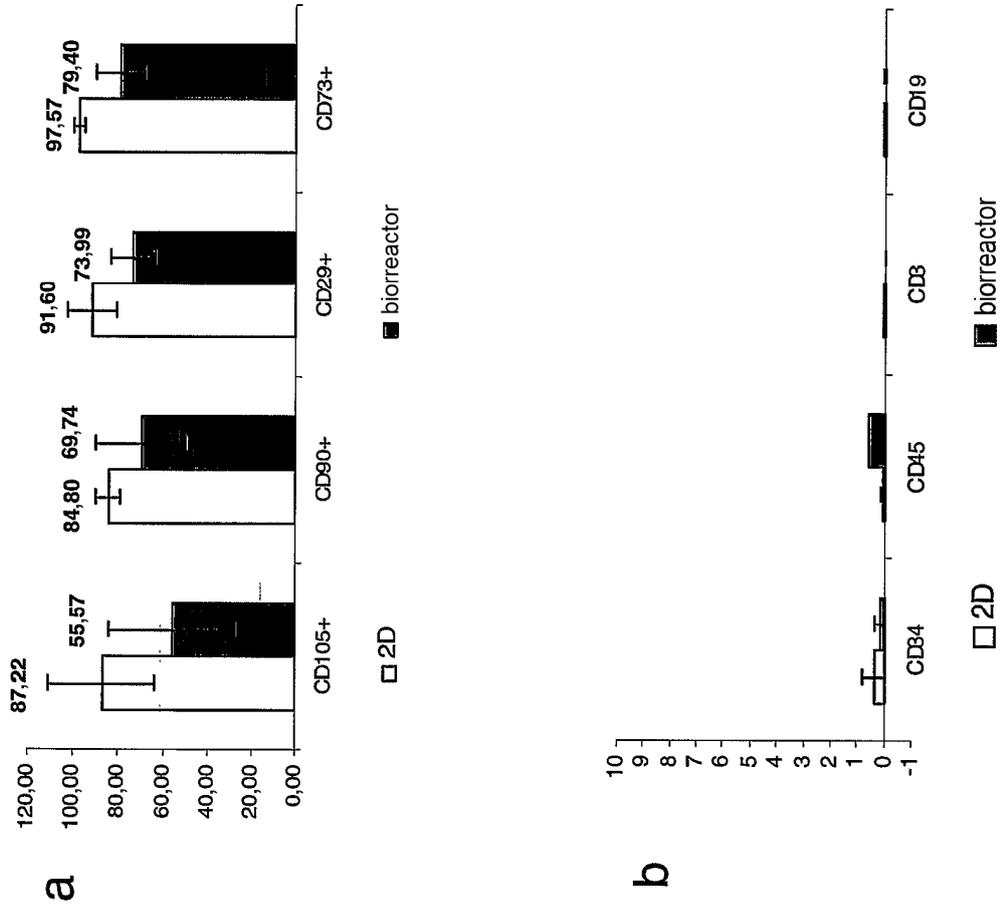


Fig. 4a

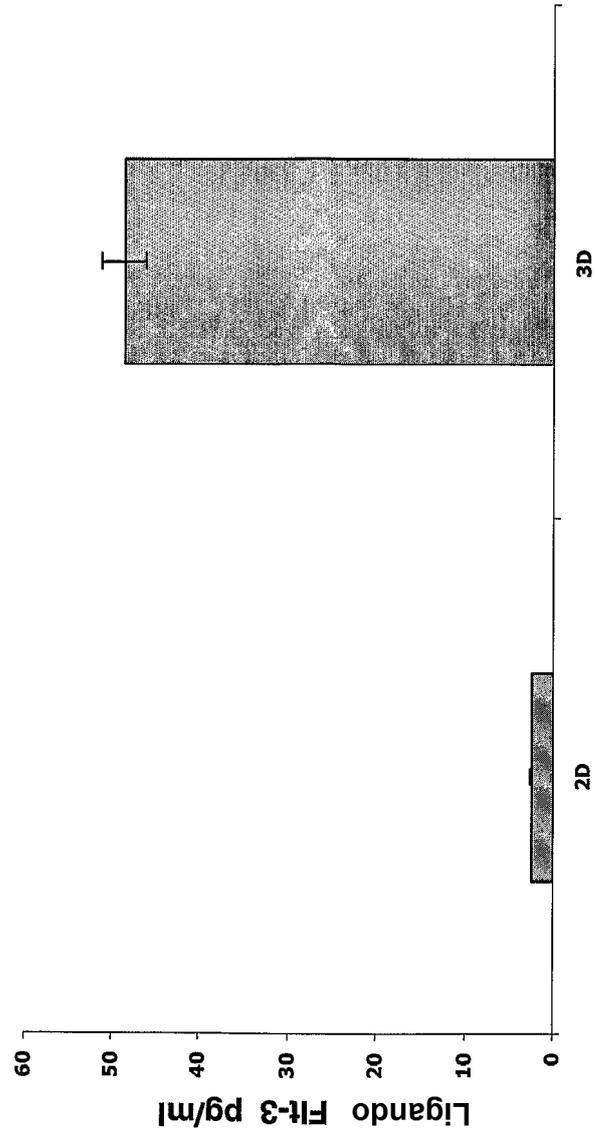


Fig. 4b

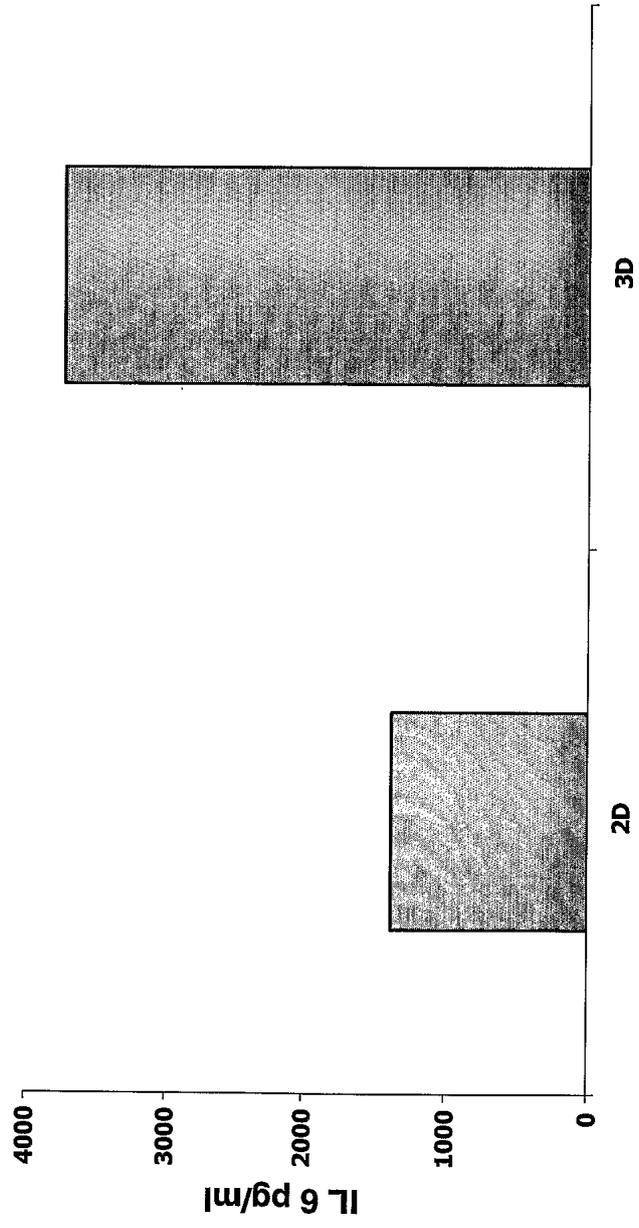
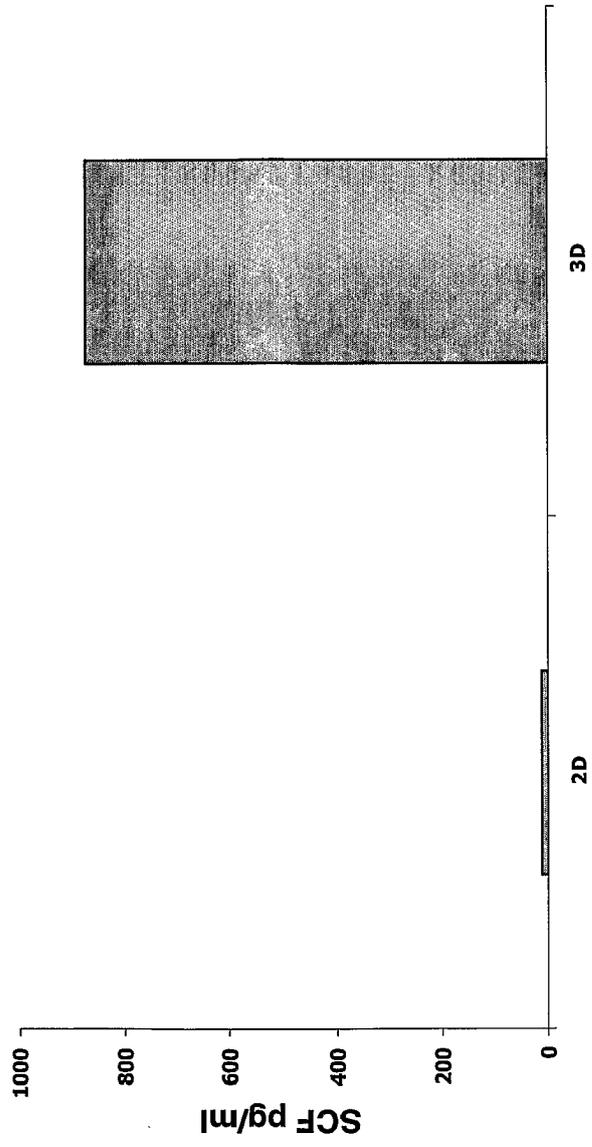
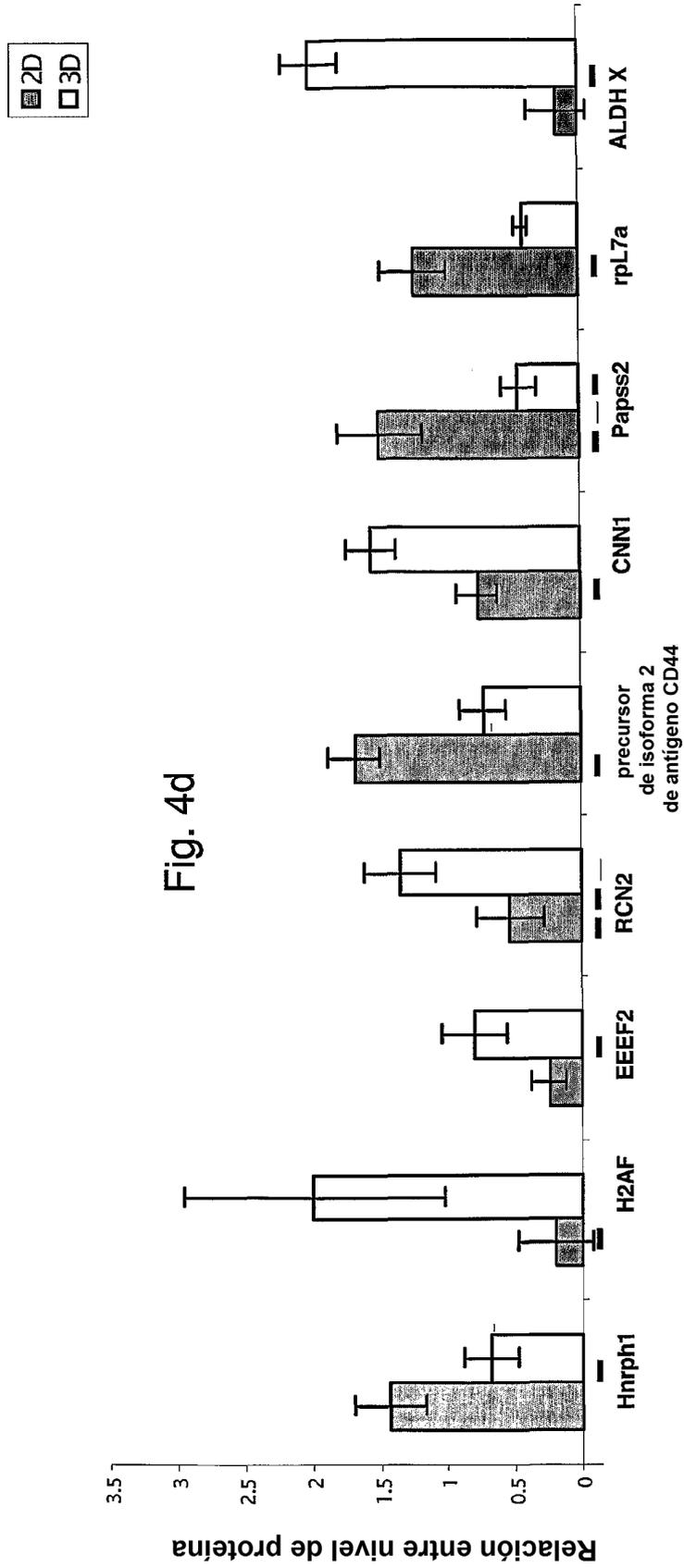
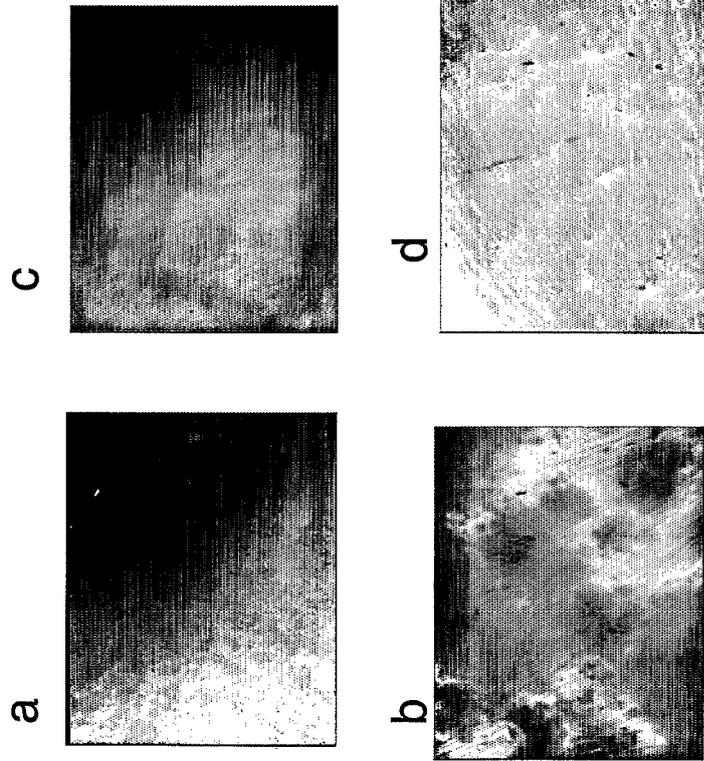


Fig. 4c





Figs. 5a-d



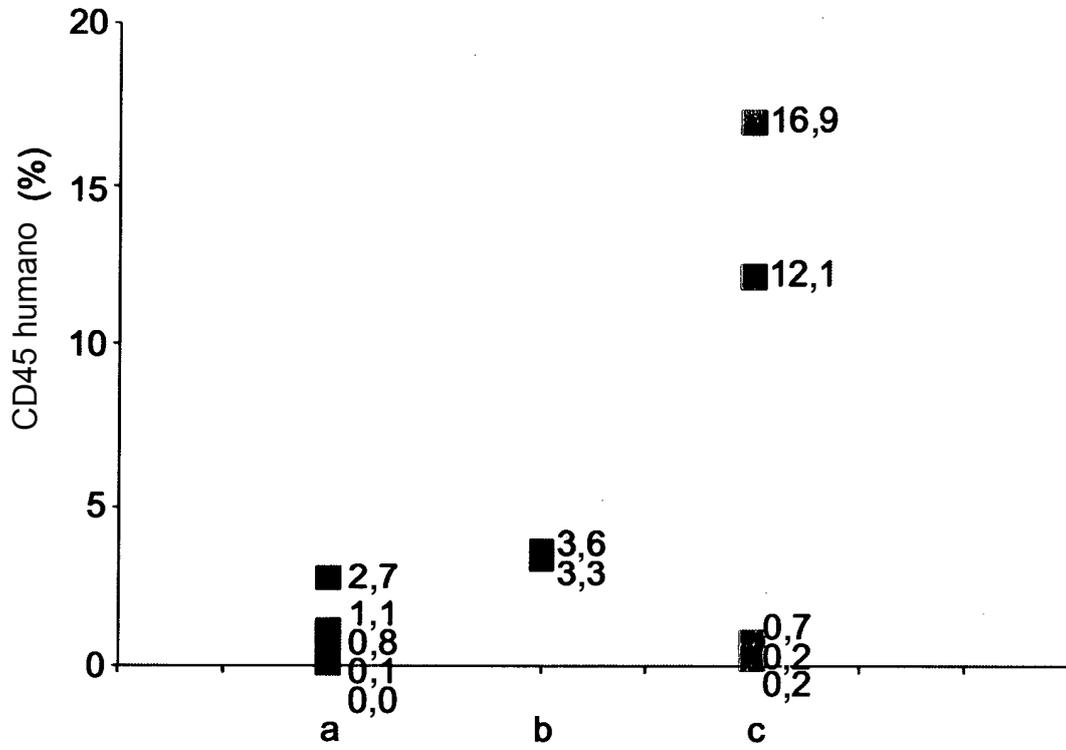
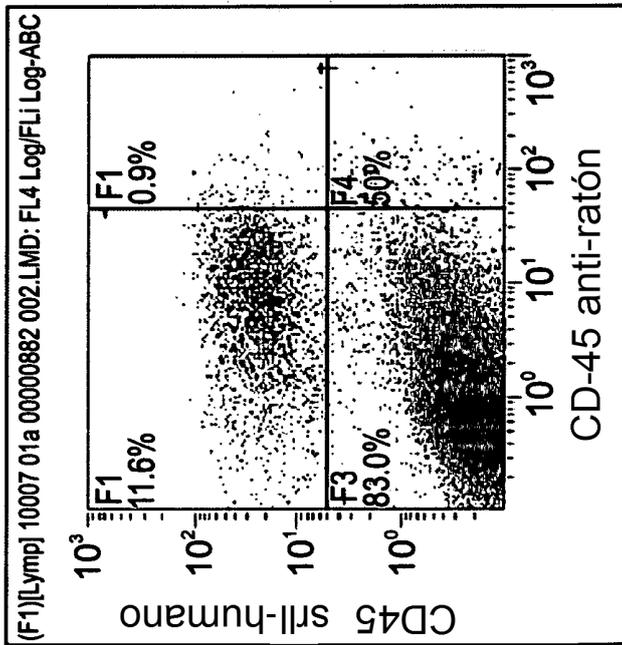
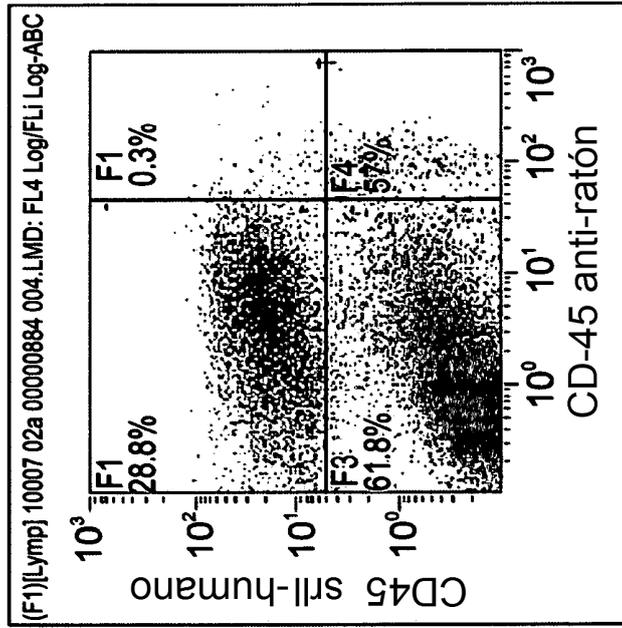


Fig. 6



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

Color	Name	% Gate	% Total	Number	Cells/ μ L
	anti -human CD45+	29.23	4.81	12407	ERROR
	anti - mouse CD45+	57.82	7.99	3997	ERROR
	lymp	100.00	84.88	42441	ERROR

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

Color	Name	% Gate	% Total	Number	Cells/ μ L
	anti -human CD45+	11.94	9.92	4961	ERROR
	anti - mouse CD45+	50.77	4.46	2229	ERROR
	lymp	100.00	83.08	41542	ERROR

Fig. 7b

Fig. 7a

CD45+ humano (%)
 CD45+ de ratón (%)

Fig. 8

