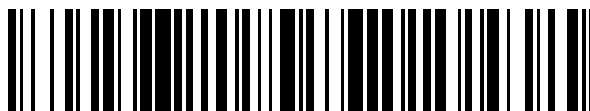


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 369**

51 Int. Cl.:

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: **03.10.2008** **E 08807881 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2203555**

54 Título: **Método optimizado y definido para el aislamiento y la preservación de células precursoras de cordón umbilical humano**

30 Prioridad:

04.10.2007 PT 10384307

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

12.09.2016

73 Titular/es:

**LABORATORIO MEDINFAR-PRODUTOS
FARMACÉUTICOS, S.A. (100.0%)
Rua Manuel Ribeiro De Pavia N 1 - 1
2700-547 Amadora, PT**

72 Inventor/es:

**GANCHAS SOARES, RITA ISABEL;
BAPTISTA COELHO, MARIA CONSTANÇA;
SILVA SANTOS, JORGE MIGUEL;
MARTINS, JOSÉ PAULO;
BASTO, VERA ALEXANDRA;
ESTILITA MONTEIRO DA CRUZ, PEDRO y
SOARES DA CRUZ, HELDER JOAQUIM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

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

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

Método optimizado y definido para el aislamiento y la preservación de células precursoras de cordón umbilical humano.

Campo técnico de la invención

- 5 Es objeto de la presente invención un método optimizado y definido para el aislamiento y la preservación de células precursoras procedentes de la matriz del cordón umbilical humano.

10 Por "célula precursora", en la presente invención, se entiende un tipo de célula capaz de adherirse y expandirse/multiplicarse en una superficie y medio de crecimiento definido, donde la mayoría de células del cultivo expresan los marcadores superficiales celulares CD44, CD73, CD90 y CD105, y la mayoría de células presentan solo una expresión residual de los marcadores superficiales celulares CD14, CD31, CD34 y CD45, donde la mayoría de células son capaces de experimentar hasta 18 fases de expansión/multiplicación, manteniendo un factor de duplicación constante de aproximadamente 1,7/24 h con una morfología de tipo fibroblasto constante, y la capacidad de diferenciación parcial o terminal en células especializadas, tales como osteoblastos, condriocitos, adipocitos, cardiomiocitos, y células gliales/neurales.

- 15 El objeto de la presente invención añade al estado de la técnica un método que es sólido, permitiendo un 100 % de eficacia con respecto a las muestras de tejido procesadas, y más eficaz, con respecto al número de citoblastos aislados por masa de cordón umbilical y tiempo dispensado.

20 Las innovaciones técnicas que son la base de la presente invención consisten fundamentalmente en dividir el proceso de aislamiento de células en tres fases independientes de recuperación de células y optimizar algunos parámetros técnicos junto con el protocolo. Hasta el momento, dichos parámetros no se han mencionado ni definido en el estado de la técnica.

25 Este método de recuperación en tres fases se basa en la recuperación secuencial de las células disociadas procedentes de tres diferentes orígenes independiente durante el proceso de aislamiento: Fase 1 - recuperación de un primer conjunto de células que son capaces de adherirse al matraz de cultivo celular donde se lleva a cabo la reacción de digestión del tejido. La adhesión se produce inmediatamente después de finalizar el periodo de incubación de la digestión, manteniéndose el matraz en reposo aún en posición horizontal, durante un periodo de 30 minutos, a temperatura ambiente, y aún en presencia de la solución de digestión. Las células adherentes se incuban a continuación en condiciones de cultivo y experimentan expansión y multiplicación hasta que alcanzan confluencia próxima a 100 %; Fase 2 - recuperación de un segundo conjunto de células procedentes del sobrenadante, como resultado de la centrifugación de la solución de digestión, después de la Fase 1. A continuación se incubaron estas células en las condiciones de cultivo, y las que fueron capaces de adherirse a la superficie de un matraz de cultivo de células experimentan expansión y multiplicación hasta que la confluencia alcanza casi el 100 %; Fase 3 - recuperación de un tercer conjunto de células a partir del aglomerado resultante de la centrifugación en Fase 2. Estas células se pueden criopreservar directamente sin adhesión, expansión, y multiplicación.

- 35 En lo que se refiere a los parámetros técnicos optimizados durante el protocolo, estos son: 1- tipo de manipulación mecánica y dimensión inicial de la fracción del cordón umbilical, 2- presencia o ausencia de coágulos de sangre en los vasos umbilicales, 3- tipo de enzima(s), acción individual o combinada y concentración de la enzima(s) en la solución de digestión, 4- composición de la solución de digestión, 5- evolución del pH durante la reacción de digestión, 6- periodo/tiempo de incubación, 7- tipo de agitación (moderada o intensa), 8- tipo de atmósfera de incubación (seca o húmeda), y 9- densidad celular durante la criopreservación.

45 La combinación de un método en tres fases para la recuperación de células disociadas con optimización de los aspectos técnicos anteriormente mencionados ha generado un método más acorde con el uso en terapia celular, basado en la administración celular. Esto se debe a la robustez del método (eficacia del 100 %) y a los altos rendimientos celulares obtenidos en un periodo de tiempo relativamente corto. Además, se optimizó también la metodología de criopreservación a fin de maximizar la viabilidad celular durante un uso futuro.

50 Con el método desarrollado recientemente, es posible obtener, desde un 100 % de las muestras de cordón umbilical procesadas, hecho que no tiene precedentes en el estado de la técnica, en nueve días, tras la congelación directa de una fracción de células, y después de dos fases individuales independientes de adhesión y expansión/multiplicación ex vivo (fin de P0) de la mayoría de las células, rendimientos de aproximadamente $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células/gramo de cordón umbilical procesado.

Aunque sin estar específicamente desarrollado para la terapia celular, el nuevo método es también adecuado para la creación de bancos de células, para usarse en protocolos de terapia génica, para ser la base de composiciones farmacológicas y cosméticas, para generar células para la producción de moléculas o compuestos moleculares, para

producir capas de células para soportes de cultivos celulares, y para producir líneas de génicas mediante genomanipulación.

Antecedentes de la invención

5 Una célula precursora (citoblasto, germinal, indiferenciada, o primitiva) es un tipo de célula con capacidad de autorenovación durante un periodo de tiempo significativo y, por encima de todo, con la capacidad de diferenciación tanto parcial como terminal en otros tipos de células más especializadas.

10 A pesar del enorme potencial de diferenciación de las células precursoras embrionicas, su utilización para la investigación o/ya la terapia es controvertida y ha planteado serias cuestiones éticas y de seguridad. De esta manera, la investigación en este campo se ha centrado en la identificación y evaluación de citoblastos no embrionicos alternativos, tales como los obtenidos de médula ósea, periostio, hueso trabecular, tejido adiposo, región sinovial, músculo esquelético, pulpa de dientes temporales y definitivos, y mucosa olfativa (Barry y Murphy, 2004; Roisen *et al.*, 2001). Se ha demostrado ya que las células aisladas procedentes de estos tejidos tienen la capacidad de diferenciación *inter alia* en condriocitos, adipocitos, osteoblastos, mioblastos, cardiomiocitos, astrocitos y tenocitos, in vitro e in vivo (Carvalho *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 1998 e Pittenger *et al.*, 1999). Dichas células precursoras, 15 aisladas de fuentes no embrionicas, y capaces de diferenciarse en células especializadas no hematopoyéticas, derivadas de tres capas germinales (endodermo, mesodermo, y ectodermo), se denominan citoblastos mesenquimales.

20 Las mayores limitaciones a la utilización de células precursoras mesenquimales surgen durante la práctica clínica, concretamente durante la recogida de las células. La recogida de células mesenquimales implica de forma invariable metodologías invasivas para el donante, tales como procedimientos quirúrgicos que (al igual que la recogida de citoblastos procedentes de médula ósea, por ejemplo) pueden incluso implicar anestesia general. Además, debido a que los citoblastos mesenquimales son raros, el número final de células obtenidas es generalmente bajo.

25 Como alternativa, se han descrito tejidos del cordón umbilical como posibles fuentes de células precursoras de adultos (Romanov *et al.*, 2003). La sangre del cordón umbilical, por ejemplo, se conoce como una fuente rica de células precursoras, pero principalmente de naturaleza hematopoyética (linaje de sangre). Debido a que los citoblastos mesenquimales están presentes en la sangre del cordón umbilical en número limitado, los intentos para aislar estas células de este tejido han resultado algo frustrantes, e incluso los intentos más satisfactorios, usando cantidades muy grandes de sangre, no han sobrepasado la tasa de éxito del 60 %, con respecto al número total de muestras de tejido procesadas. Y en este extremo, persisten todavía dudas acerca del origen de las células 30 aisladas; esto es, sería el origen de las células realmente la sangre, u otro tejido fetal (Chul-Wan *et al.*, 2003; Bieback *et al.*, 2004).

Otros informes describen el aislamiento de los citoblastos mesenquimales de otros tejidos constituyentes del cordón umbilical, considerablemente más ricos en naturaleza mesenquimal que la sangre umbilical. Algunos ejemplos de estos procedimientos se basan en la matriz del cordón umbilical, conocida también por gelatina de Wharton (Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2006; Lu-Lu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006); la vena del cordón umbilical (Romanov *et al.*, 2003; Auger *et al.*, 2005), los tejidos arteriales (Kadner *et al.*, 2004); u otros tejidos de revestimiento, tales como la membrana amniótica (Phan *et al.*, 2004). 35

40 Un análisis detallado revela que los protocolos descritos son, de una manera u otra, restrictivos en términos de la naturaleza de las células obtenidas, o más bien vagos en términos de tasa de éxito y eficacia en el número de células aisladas. De hecho, la naturaleza restrictiva de estos protocolos dio como resultado invariablemente la pérdida de diversidad fenotípica de las poblaciones celulares aisladas, debido principalmente a la atención innecesaria en tejidos específicos o localizaciones geográficas en la estructura del cordón umbilical. Además, la incertidumbre se mantiene invariable acerca del número real de citoblastos que podrían obtenerse al final.

45 De esta manera, por ejemplo, el protocolo de la Cell Research Corporation que se basa únicamente en la membrana amniótica como fuente de citoblastos mesenquimales, origina células ya predispuestas al linaje endotelial (Phan *et al.*, 2004). Adicionalmente, ninguno de los métodos descritos hasta el momento ha demostrado eficacia en términos de cantidades de muestras de tejido correctamente procesadas para que sean suficientemente fiables con el fin de aplicarse en protocolos de terapia celular. En otras palabras, aunque la tasa de éxito para el aislamiento de células mesenquimales procedentes de matriz umbilical es mayor que de sangre de cordón umbilical, o incluso médula 50 ósea, no existe hasta ahora un método que garantice una tasa de éxito del 100 % para el aislamiento, en términos de cantidades de muestras de tejidos procesadas, de tal manera que el resultado final sea lo suficientemente sólido para aplicaciones de terapia celular (Deryl y Weiss, 2008).

55 Además, la introducción de etapas innecesarias de manipulación estructural, tales como la extracción de vasos umbilicales (Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), o la maceración mecánica (Seyda *et al.*, 2006), hace que los protocolos existentes sean difíciles de normalizar y reproduce, sin

garantizar nunca que existan suficientes números de células para la aplicación de la terapia celular.

Además, una manipulación excesiva del tejido induce una diferenciación celular que es indeseable si se desea mantener el fenotipo celular precursor (Gardner *et al.*, 2000; Claes *et al.*, 2002; Cullinane *et al.*, 2003).

5 También muestran limitaciones los protocolos basados en los propios vasos umbilicales. Estos protocolos implican extracciones complejas de las arterias o la vena umbilical y limitan el potencial de diferenciación de los citoblastos mesenquimales a los linajes subendotelial y endotelial (Romanov *et al.*, 2003; Auger *et al.*, 2005; Kadner *et al.*, 2004; Sarugaser *et al.*, 2005).

10 Finalmente, no menos complejos son los protocolos que se basan en la gelatina de Wharton (WJ) como fuente de citoblastos mesenquimales. Estos informes no son consistentes, contribuyendo también a la carencia de definición y criterios de las metodologías aplicadas. De esta manera, aunque Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; y Wang *et al.*, 2006, llevan a cabo una extracción de vasos inicial, compleja y difícilmente reproducible, procesando el tejido restante para el aislamiento celular, Davies *et al.*, 2004, retiran también los vasos umbilicales, pero, en vez de usar el tejido restante, procesan el tejido todavía acoplado alrededor de los vasos para el aislamiento celular, descartando el primero. Sin embargo, todos los autores son unánimes en afirmar que sus protocolos están basados en WJ
15 exclusivamente (Purchio *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006). La discrepancia entre estas soluciones es injustificada y el exceso de manipulación del tejido de los tejidos existentes en cualquiera de estos dos protocolos menoscaba los efectos deseables sobre el mantenimiento del fenotipo precursor, y por consiguiente pone en peligro la utilización de las células precursoras aisladas en servicios de aislamiento y criopreservación para la población en general.

20 El estado de la técnica no encuentra claramente un método basado en un protocolo simple, robusto, y definido, de tal manera que pueda reproducirse con garantías de eficacia y eficiencia. Una vez que los citoblastos mesenquimales resultan aplicables en terapia celular, es necesario asegurar al paciente que el método utilizado para el aislamiento celular proporcionará la calidad y cantidad necesarias del agente terapéutico. Dada la ausencia de garantías presentadas por los protocolos descritos hasta el momento en el estado de la técnica, se prevé que la
25 presente invención suprimirá la necesidad de un método con las anteriores características.

Descripción general de la invención

La presente invención pretende añadir al estado de la técnica un método de selección para el aislamiento de células precursoras procedentes de cordón umbilical humano, con un carácter mesenquimal especificado, basándose en una estrategia de selección mediante la digestión específica de colágeno, el material de soporte de la matriz del
30 cordón umbilical (gelatina de Wharton).

La liberación celular se produce sin manipulación mecánica del tejido inicial, asegurando de esta manera que el fenotipo celular original permanece intacto y se mantiene la viabilidad celular. Por "manipulación mecánica", en la presente invención, se entiende maceración y/o trituración de cualquier tejido en las regiones subamniótica, intervacular, y perivascular del cordón umbilical; y/o la extracción de los vasos del cordón umbilical; y/o cualquier
35 otro efecto mecánico que pueda interferir con la estabilidad, y consiguientemente con el fenotipo y la viabilidad de las células presentes en la matriz del cordón umbilical (gelatina de Wharton).

Además de la ausencia de manipulación mecánica, la introducción de tres fases independientes para la recuperación de células disociadas y la optimización de varios parámetros técnicos a lo largo del proceso hace el método simple, robusto, 100 % fiable en términos de eficacia, y muy eficiente en término de número de células
40 obtenidas con relación al tiempo. Como resultado, el método se puede aplicar en servicios de terapia celular, así como en la criopreservación de citoblastos mesenquimales resultante del aislamiento para un futuro uso autólogo.

El resultado de introducir un proceso en tres fases secuencias para el aislamiento y la optimización celular de características técnicas individuales hasta el momento, o bien no se menciona o describe de una manera indefinida en el estado de la técnica, se evaluó de acuerdo con los rendimientos celulares totales obtenidos después de que se
45 introdujo cada variable. Los rendimientos celulares totales corresponden a una pequeña porción de células que se congela directamente en la fase vapor del nitrógeno líquido, sin experimentar una fase de adhesión y expansión/multiplicación más dos grupos de células previamente aisladas bien a partir de una primera fase de selección de la adhesión, justo después de la digestión del tejido, y una segunda fase de selección de la adhesión, justo después de la centrifugación del producto de la digestión. Estos conjuntos experimentan una fase de adhesión y expansión/multiplicación y se criopreservan una vez que los correspondientes cultivos alcanzan una confluencia
50 máxima, antes de cualquier pase (final de P0).

Por "pase (P)" en la presente invención, se entiende el reinóculo, precedido por la tripsinización, de células adherentes, después que las células adherentes han alcanzado una confluencia (densidad celular) en la superficie de crecimiento de casi un 100 % debido a su expansión/multiplicación en un medio de crecimiento definido; con el fin

de aumentar simultáneamente la superficie de adhesión y expansión, así como el volumen total del medio de crecimiento, a fin de iniciar una nueva fase de expansión/multiplicación.

Por "confluencia máxima", en la presente invención, se entiende que la superficie de crecimiento del soporte del cultivo está uniformemente cubierta por una monocapa de células.

- 5 Las tres fases de recuperación secuencial que comprende el método de tres fases son: Fase 1 - recuperación de un primer conjunto de células que son capaces de adherirse a la superficie del matraz de cultivo celular donde se lleva a cabo la reacción de digestión del tejido, aún en presencia de la solución de digestión. Fase 2- recuperación de un segundo conjunto de células procedente de la centrifugación de la solución de digestión que son capaces de adherirse a la superficie de otro matraz de cultivo celular en una solución que consiste en el sobrenadante y el medio de cultivo. Fase 3 - recuperación de un tercer conjunto de células a partir del aglomerado resultante de la centrifugación en Fase 2. Estas células se criopreservan directamente sin adhesión y expansión/multiplicación.

A la vez, los parámetros técnicos optimizados fueron:

- 1- Dimensión de las fracciones de tejido iniciales que se van a usar en la reacción de digestión, manteniendo una proporción constante de masa de tejido (g), área superficial de la parte inferior del matraz de digestión (cm²), volumen de digestión (ml), y el volumen total del matraz (ml), de aproximadamente 1:2:2:37, considerando que la fracción de 1 cm de cordón umbilical humano pesa aproximadamente 1 g. Tras retirar la membrana amniótica, se ensayaron algunos tipos de métodos de fraccionamiento: bajo (fracciones de 5 cm); medio (fracciones de 2,5 cm); alto (fracciones de 0,3 cm); y picado del tejido. Todos los fraccionamientos se llevaron a cabo con la ayuda de un escalpelo y se procesaron las muestras utilizando exactamente las mismas condiciones. Se concluyó que los mejores rendimientos en términos de células totales al final de P0/masa de cordón umbilical/tiempo se obtenían cuando se utilizaban fracciones de 2,5 cm.

- 2- Presencia o ausencia de coágulos de sangre en vasos de tejidos (1 vena y 2 arterias): se sabe que la lisis de los glóbulos sanguíneos es tóxica, reduciendo la viabilidad celular in vitro. Por tanto, se compararon los rendimientos celulares cuando se llevó a cabo la digestión en presencia o ausencia de coágulos de sangre. Para lo último, se usó un escalpelo para producir incisiones longitudinales en los vasos sanguíneos a fin de producir una apertura a partir de la cual podrían retirarse los coágulos. Se concluyó que los coágulos sanguíneos tienen un efecto negativo en los rendimientos de células totales.

- 3- Naturaleza de la(s) enzima(s), concentración, y acción individual o combinada de las enzimas utilizadas en la etapa de digestión del tejido: adhesión directa de células al matraz de cultivo, en presencia de medio de cultivo, sin digestión, y por tanto en la ausencia de enzimas; y disociación del tejido con una única enzima: se ensayaron 0,075 % (p/v) de colagenasa II o 2,0 % (p/v) de pronasa. Como la utilización de la colagenasa II sola fue la solución más eficaz, esta enzima se combinó a continuación con otras enzimas, específicamente con Tripsina al 0,125 % (p/v) (en presencia o ausencia de EDTA 0,260 mM) con hialuronidasa al 0,5 % (p/v) sola, y con hialuronidasa al 0,5 % (p/v) combinada con pronasa 2,0 % (p/v). Se obtuvieron los mejores rendimientos, en términos de células totales al final de P0/masa de cordón umbilical/tiempo, mediante la acción combinada de colagenasa II al 0,075 % (p/v) con tripsina al 0,125 % (p/v). Además, cuando la concentración de colagenasa II se cambió (0,0375 %, 0,075 % y 0,15 % p/v), que mantiene una concentración de tripsina de 0,125 % (p/v), en presencia de 0,260 mM de EDTA, se confirmó que la concentración de colagenasa II de 0,075 (p/v) proporciona los mejores resultados, manteniendo constantes las condiciones previamente optimizadas.

- 4- Composición de la solución de digestión: se ensayaron composiciones de soluciones de digestión enzimática, concretamente Alpha-Mem suplementado con 20 % de FBS y 1 % Penicilina/estreptomycin; solución salina tamponada, por ejemplo, HBSS, suplementada con EDTA, más específicamente con 186 mg/ml de CaCl₂ · 2H₂O, 400 mg/ml de KCl, 60 mg/ml de K₂HPO₄, 200 mg/ml de MgSO₄ · 7H₂O, 8000 mg/ml de NaCl, 350 mg/ml de NaHCO₃, 90 mg/ml de NaH₂PO₄ · 7H₂O, 1000 mg/ml de glucosa, y 76 mg/ml (0,260 mM) de EDTA; la solución HBSS previa suplementada con 5 mM de CaCl₂; tampón HEPES 25 mM suplementado con CaCl₂ 5 mM. La solución salina tampón (HBSS), suplementada con EDTA 0,260 mM produjo los mejores rendimientos.

- 5- Control de la evolución del pH durante la reacción de digestión: se controló el pH a lo largo del proceso de digestión y se advirtió una acidificación del medio. En promedio, cuando se usa la acción combinada de la colagenasa II al 0,075 % (p/v), con tripsina al 0,125 % (p/v), en una solución salina de Hank (HBSS), suplementada con EDTA 0,260 mM, el pH inicial era de 7,2, disminuyendo a 6,4 después de una incubación de 4 h y a 5,9 después de 16 h. La acidificación del medio puede explicar la ausencia de eficacia en el aislamiento de células después de largos periodos de incubación (16 h). A pesar del hecho de que existen más digestiones completas tras periodos de incubación largos, la acidificación del medio se vuelve perjudicial para la viabilidad celular. El pH de la solución es por tanto un parámetro a tener en consideración cuando se planifican periodos de incubación, y no deben estar nunca por debajo de 6,4 cuando se vuelve perjudicial para la eficacia del método, como se ha determinado por el recuento de células aisladas viables. Aunque se observaron las digestiones más completas a 16 h, se encontró que los periodos más extendidos tenían un impacto negativo sobre la viabilidad celular y condujo a una acidificación del

medio significativa

6- El periodo/tiempo de incubación para la reacción de digestión: se ensayaron algunos periodos de incubación (2 h, 4 h, 6 h, y 16 h). Se concluyó que una incubación de 4 h produjo los mejores rendimientos.

5 7- Tipo de agitación (moderada o vigorosa) durante el periodo de incubación de la reacción de digestión: la incubación se llevó a cabo en un baño de agua con agitación orbital con tasas de oscilación tanto moderadas como vigorosas, consistentes en 100 oscilaciones por minuto (opm) y 140 oscilaciones por minuto (opm), respectivamente. La agitación moderada de 100 opm condujo a mejores resultados en términos de rendimientos celulares.

10 8- la atmósfera de incubación de la digestión enzimática (seca o húmeda); se llevó a cabo la incubación a 37 °C en dos entornos diferentes: húmeda y seca. Para las muestras del tejido de ensayo se procesaron en paralelo tanto en un agitador orbital imMersed, donde el intercambio de calor se produjo a través de agua y aire saturado, o en una cámara seca, donde el intercambio de calor se produjo a través de aire seco. La incubación en la cámara seca dio como resultado mejores rendimientos celulares.

15 9- El efecto de la densidad celular en la eficacia de criopreservación de las células tras experimentar una fase de adhesión y expansión/multiplicación: 1 ml de suspensiones celulares se congeló al final de P0 en la fase vapor del nitrógeno líquido, a diferentes densidades (células/ml), en una solución compuesta de 10 % de dimetil sulfoxido (DMSO) y 90 % de suero de feto bovino (FBS). Se determinaron la viabilidad celular tras la descongelación (células viables/células totales) y la recuperación celular (células viables contadas tras la descongelación/células viables contadas antes de la criopreservación) para cada dolencia. Los resultados obtenidos mostraron que una densidad celular de 3×10^6 células/ml era más probable que asegurara un mantenimiento adecuado y la recuperación de células viables tras la criopreservación en las condiciones ensayadas.

25 En general, y dadas las optimizaciones descritas anteriormente, la invención se basa en un método de selección para aislar células precursoras a partir del cordón umbilical humano, donde se extrae completamente la sangre de cada cordón umbilical y se transporta al laboratorio en tampón salino, que contiene glucosa y antibióticos, siempre en un entorno estéril, preferentemente a temperatura ambiente si se procesa en 48 h. durante periodos de almacenamiento más largos, es aconsejable una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

Se llevaron a cabo las siguientes etapas, que implicaban el procesamiento del cordón umbilical y el aislamiento de células precursoras, en una cámara de campana de flujo laminar de flujo vertical, en condiciones estériles.

30 En primer lugar, la membrana amniótica, que es la estructura de revestimiento que ha estado en contacto con el aire durante la recogida del tejido, y de esta manera, susceptible a la contaminación microbiana, se despegó y el cordón umbilical se lavó con una nueva solución salina.

Genéricamente, a fin de aislar las células precursoras deseadas, el método comienza con fracciones de dimensión definida, derivadas de un fraccionamiento de tejido optimizado que no implica la manipulación mecánica de los tejidos, incluyendo cualquier extracción de estructuras internas del órgano, excepto para los coágulos de sangre con vasos umbilicales cuando sea aplicable.

35 La liberación de células desde el tejido umbilical está promovida por una digestión enzimática dirigida hacia la matriz del cordón umbilical, respecto a una relación proporcional establecida entre la masa del tejido (g) la superficie del matraz de digestión donde se confina el tejido (cm^2), el volumen de la solución de digestión (ml), y el volumen total del matraz de digestión (ml), de aproximadamente 1:2:2:37; considerando que, en promedio, una fracción de 1 cm de cordón umbilical pesa 1 g.

40 A fin de proceder con la digestión enzimática, se usa una combinación específica de enzimas, a concentraciones especificadas, en una solución con una composición definida, durante un periodo de incubación a un pH mínimo específico, y un tipo de agitación y una atmósfera de incubación igualmente especificadas.

45 La recuperación de las células disociadas procede en tres fases, donde en una primera fase, se recupera un conjunto de células que son capaces de adherirse a la superficie del matraz de cultivo celular donde se lleva a cabo la reacción de digestión del tejido. La adhesión se produce inmediatamente después del periodo de incubación de la digestión, manteniéndose el matraz en reposo aún en posición horizontal, durante un periodo entre 10 minutos y 120 minutos, preferentemente 30 minutos, a temperatura ambiente. En una segunda fase, se recupera un nuevo conjunto de células del sobrenadante como resultado de la centrifugación de la solución de digestión, después de la Fase 1. En la fase 1 y la fase 2 se incubaron estas células en las condiciones de cultivo, y las que fueron capaces de adherirse a la superficie de un matraz de cultivo de células experimentaron una fase de expansión y multiplicación hasta que la confluencia alcanza casi el 100 %. Finalmente, en la Fase 3, se recupera un conjunto de células procedentes del aglomerado resultante de la centrifugación en Fase 2 y se criopreserva directamente sin experimentar ningún ciclo de adhesión y expansión/multiplicación.

La recuperación secuencial de células y todos los otros factores optimizados descritos previamente se optimizaron de tal manera que el método presenta una eficacia del 100 % y una eficacia máxima en términos de número de células seleccionadas y aisladas. A la vez, la población celular obtenida puede identificarse por las células que son capaces de adherirse y expandirse/multiplicarse en una superficie y medio de crecimiento definidos, donde la mayoría de células en cultivo expresa los marcadores superficiales celulares CD44, CD73, CD90 y CD105 y la mayoría de células presenta solo la expresión residual de los marcadores superficiales celulares CD14, CD31, CD34 y CD45, donde la mayoría de células son capaces de experimentar hasta 18 fases de expansión/multiplicación manteniendo un factor de duplicación constante de aproximadamente 1,7/24h, una morfología de tipo fibroblasto constante, y la capacidad de diferenciación parcial o terminal en células especializadas, tales como osteoblastos, condriocitos, adipocitos, cardiomiocitos, y células gliales.

Adicionalmente, la presente invención contempla la optimización de la densidad celular (células/vol) para la criopreservación de células que experimentan un ciclo de adhesión y expansión/multiplicación, con el objetivo de maximizar la eficacia en términos de viabilidad celular para usos futuros.

Con el nuevo método es posible obtener, con cada muestra de cordón umbilical, un hecho que no tiene precedentes en el estado de la técnica, en nueve días, tras la congelación directa de una fracción de células, y después de dos fases independientes de adhesión y expansión/multiplicación *ex vivo* (fin de P0), rendimientos de aproximadamente $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células/gramo de cordón umbilical.

Aunque el nuevo método se ha desarrollado para aplicarse principalmente en protocolos de terapia celular, es también adecuado para otros fines, tales como bancos de células, protocolos de terapia génica, composiciones farmacológicas y cosméticas, producción de moléculas o compuestos moleculares, producción de capas de células para soporte de cultivos celulares y para la producción de líneas de células mediante genomanipulación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: La citometría de flujo da como resultado células derivadas de matriz de cordón umbilical. Las células se inmunomarcaron utilizando anticuerpos unidos a PE o FITC contra CD44 (97 % de células positivas), CD73 (99 % de células positivas), CD90 (97 % de células positivas) y CD105 (95 % de células positivas), todos los marcadores positivos para las células del estroma mesenquimal.

Figura 2: La citometría de flujo da como resultado células derivadas de matriz de cordón umbilical. Las células se inmunomarcaron utilizando anticuerpos unidos a PE o FITC contra antígenos conocidos por ser marcadores negativos del linaje mesenquimal: CD14, linaje monocítico (< de 1 % de células positivas), CD34, específicas del linaje hematopoyético (1,2 % de células positivas), CD31, marcador endotelial (1 % de células positivas), y CD45 (1,1 % de células positivas), marcador panleucocitos.

Figura 3: Efecto de la densidad celular sobre la eficacia de la criopreservación celular tras la adhesión y la expansión/multiplicación celular: A - viabilidad tras la descongelación (células viables / células totales x 100 %) para diferentes densidades celulares. B - Recuperación celular (células viables recuperadas tras la descongelación / número inicial de células viables congeladas). Se obtuvieron los mejores resultados con una densidad celular de 3×10^6 células/ml para las condiciones ensayadas (criotubos estériles de 1,5 ml que contenían 1 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio de cabeza).

Figura 4: Expansión *in vitro* de células descongeladas. El factor de duplicación observado era 1,7/24h, similar al observado para estas células antes de la criopreservación. Se observó una confluencia de 80-90 % 36 h después de la descongelación (con intercambio de medio después de 24h): A - Células precursoras 12 h después de la descongelación, antes del intercambio de medio. B - Células precursoras 36 h después de la descongelación (intercambio de medio llevado a cabo después de 24 h). Barra: 100 μ m.

Figura 5: Diferenciación de células precursoras aisladas en osteoblastos, adipocitos y condriocitos. A - Morfología celular de células control (células no diferenciadas) en medio de crecimiento normal. B - Diferenciación osteogénica: se inocularon las células en medio de diferenciación osteogénica y se mantuvieron durante 3 semanas antes de la tinción con fosfatasa alcalina. C - Diferenciación adipogénica: se añadió medio de diferenciación adipogénico a cultivos de células completamente confluentes y se mantuvieron las células durante 3 semanas antes de la tinción con Oil-O-red. D - Diferenciación condriogénica: se volvieron a suspender las células y se mantuvieron en un tubo de centrífuga en medio de diferenciación condriogénica durante 4 semanas. Se tiñeron a continuación las células con Alcian blue y hematoxilina. Barra: 100 μ m.

Figura 6: Diferenciación de células precursoras aisladas en cardiomiocitos. A - Morfología celular de células control (células no diferenciadas) en medio de crecimiento normal Alpha-Mem, suplementado con 10 % de FBS y 1 % de penicilina /estreptomicina. B - Morfología celular tras la diferenciación cardiomiogénica. C - Células control (células no diferenciadas) marcadas con DAPI y con un anticuerpo contra Troponina T, un marcador cardiomiocítico específico. Solo se observaron los núcleos marcados con DAPI. D - Se pueden observar células diferenciadas marcadas con DAPI y con un anticuerpo contra Troponina T. núcleos marcados con DAPI y citoesqueleto marcado con Troponina T.

Figura 7: Diferenciación de células precursoras aisladas en células gliales/neurales. A - Morfología celular de células control (células no diferenciadas) en medio de crecimiento normal Alpha-Mem, suplementado con 10 % de FBS y 1 % de penicilina /estreptomicina. B - Morfología celular tras la diferenciación glial/neural. C - Células control (células no diferenciadas) marcadas con DAPI y con un anticuerpo contra β - tubulina III, una proteína neuronal específica. Solo se observaron los núcleos marcados con DAPI. D - Células diferenciadas marcadas con DAPI y con un anticuerpo contra la β -tubulina III. Se pueden observar los núcleos marcados con DAPI y el citoesqueleto marcado con β -tubulina III.

Descripción detallada de la invención

Antes de la aplicación del método el cordón umbilical humano debe separarse de la sangre y transportarse a instalaciones de laboratorio, en un recipiente cerrado estéril, tanto en seco, como preferentemente incluido en una solución estéril que contiene 186 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ de KCl, 60 $\mu\text{g/ml}$ de K_2HPO_4 , 200 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 $\mu\text{g/ml}$ de NaCl, 350 $\mu\text{g/ml}$ de NaHCO_3 , 90 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa, y 1 % de una mezcla equimolar de penicilina y estreptomicina, preferentemente a temperatura ambiente si se procesa en un periodo de 72 h, o entre 2 y 8 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente a 4 $^{\circ}\text{C}$, si se procesa en un periodo entre 48 y 144 h después de la recogida, sin o preferentemente con una solución salina estéril, tal como HBSS. La solución salina puede suplementarse con nutrientes y antibióticos, por ejemplo, 1 g/l de glucosa, 100 u/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina.

El método debe llevarse a cabo en un entorno estéril, por ejemplo, en el interior de una campana de flujo laminar. El cordón umbilical se lava 3 veces con solución salina tamponada de Hank (HBSS) y la membrana amniótica que rodea el cordón umbilical se retira con la ayuda de pinzas estériles.

A continuación, el cordón umbilical se fracciona transversalmente con la ayuda de un escalpelo en fracciones de aproximadamente 2,5 cm. Teniendo en cuenta la densidad promedio del cordón umbilical humano (próxima a 1 g/cm), cada fracción corresponde a aproximadamente 2,5 g de tejido.

Si están presentes en estas fracciones, los coágulos de sangre deben retirarse con la ayuda de un escalpelo. En las siguientes etapas, cada grupo de siete fracciones de 2,5 g exentas de coágulos de sangre se tratan independientemente.

Se obtuvieron las células de la disociación de cada grupo de 7 fracción, llevadas a cabo en un matraz estéril y precintado que contenía una solución de digestión con pH tamponado, mediante la acción combinada de la colagenasa II, a una concentración de 0,075 % (peso/volumen de digestión total), con tripsina, a una concentración de 0,125 % (peso/volumen de digestión total), manteniendo una relación constante entre la masa de tejido, el área superficial de la parte inferior del matraz, el volumen de digestión, y el volumen total del matraz, de aproximadamente 1:2:2:37, y donde el matraz se incubó en condiciones definidas de tiempo de incubación, temperatura, entorno de calentamiento, y humedad ambiente y agitación; más específicamente, comenzando a partir de un grupo de 7 fracciones de cordones umbilicales con aproximadamente 2,5 cm (2,5 g) cada uno, exento de coágulos de sangre; utilizando un volumen de solución de digestión de 35 ml; en un matraz de cultivo no venteado y cerrado tal como un T_{175} con un volumen total de 650 ml, y un espacio de cabeza durante la digestión de 615 ml menos el volumen sumergido de las 7 fracciones en digestión; y donde la solución de digestión consiste en, excluyendo las enzimas, 186 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/ml}$ de KCl, 60 $\mu\text{g/ml}$ de K_2HPO_4 , 200 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 $\mu\text{g/ml}$ de NaCl, 350 $\mu\text{g/ml}$ de NaHCO_3 , 90 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa, y 76 $\mu\text{g/ml}$ (0,260 mM) de EDTA; manteniendo el pH a 6,4 o superior; y donde la reacción enzimática se incubó durante 4 h; a una temperatura constante de 37 $^{\circ}\text{C}$; en una incubadora seca cerrada; con agitación, a una velocidad constante de 100 oscilaciones.min⁻¹ (opm).

Se llevó a cabo la recuperación de las células obtenidas a partir de la disociación del tejido en tres fases (método en tres fases).

En una primera fase, se recuperaron las células del tejido disociado, más específicamente procedentes de una incubación horizontal estática del matraz cuando la digestión tiene lugar durante un periodo de tiempo de 5 a 300 minutos, preferentemente de 30 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante de la digestión se transfirió por medio de pipeteado, evitando la succión de cualquier tejido sin digerir, a un tubo de centrífuga de 50 ml. Se descartó

cualquier tejido sin digerir. En este momento, 35 ml de medio de cultivo basal, suplementado con desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos, y 10 % de suero de feto bovino (FBS) se añadieron al matraz de digestión. El tapón del matraz no venteado se sustituyó por un filtro que contenía el tapón venteado y el matraz de digestión se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 7 % de CO₂. Deben de llevarse a cabo cambios en el medio de cultivo total cada 72 h para promover el crecimiento de las células que se adhieren durante el periodo de incubación horizontal (periodo de selección) hasta que se consigue una confluencia máxima en la superficie.

En una segunda fase de recuperación, se recuperaron las células a partir del sobrenadante de la digestión en un tubo de centrífuga de 50 ml, a 350 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, 35 ml de sobrenadante se transfirieron a un matraz de cultivo estático (T₁₇₅) con un filtro que contenía un tapón venteado; y se añadieron 35 ml de medio de cultivo basal suplementado con desoxirribonucleasas, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos y 10 % de suero de feto bovino (FBS). A continuación, se incubó el matraz a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 7 % de CO₂, y el medio de cultivo total culture cambió cada 72 h a fin de promover la adhesión celular y la expansión/multiplicación hasta que se consiguió la confluencia máxima en la superficie.

Las poblaciones celulares obtenidas de la primera y segunda fases se criopreservaron tras la primera adhesión y el ciclo de expansión/multiplicación (fin de P0). Esto consiste en la criopreservación directa en la fase vapor del nitrógeno líquido de una mezcla de 0,5 ml de suspensión celular, que contenía el número de células totales deseado, y el mismo volumen de una solución de suero de feto bovino (FBS) que contenía 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO), para obtener una concentración final de aproximadamente 3x10⁶ células/ml, en un criovial estéril de 1,5 ml, que contenía por tanto 1,0 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio de cabeza.

La tercera fase y final de la recuperación celular consiste en la criopreservación directa del aglomerado celular obtenido mediante la centrifugación descrita anteriormente del sobrenadante de la digestión, resuspendido en 2 ml de una solución que consiste en suero de feto bovino (FBS), que contenía un 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO), utilizando un congelador de velocidad controlada con una velocidad de disminución de la temperatura de 1 °C.min⁻¹, hasta por debajo de -80 °C, en un criovial estéril de 2,5 ml que contenía 2 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio de cabeza.

Las células criopreservadas se pueden recuperar cuando es necesario a través de un rápido proceso de descongelación en un baño de agua a 37 °C. A continuación, las células se vuelven a suspender en un medio de cultivo a la misma temperatura con un factor de dilución de 1:10. Se pueden llevar a cabo posteriores ciclos de expansión usando densidades de inóculo entre 5,0x10³ y 2,0x10⁴ células/cm², con un intercambio total de medio cada 72 h. Las células presentan normalmente un factor de duplicación de 1,7/24h.

Ejemplo 1: Optimización del tipo/cantidad de manipulación mecánica y dimensión de la fracción

El tipo de manipulación mecánica y el tamaño de los fragmentos de tejido iniciales se optimizaron a una proporción constante de masa de tejido (g), área superficial de la parte inferior del matraz de digestión (cm²), volumen de digestión (ml), y el volumen total del matraz (ml), de aproximadamente 1:2:2:37, considerando que la fracción de 1 cm de cordón umbilical humano pesa aproximadamente 1 g. Tras retirar la membrana amniótica, se ensayaron algunos tipos de métodos de fraccionamiento: bajo (fracciones de 5 cm); medio (fracciones de 2,5 cm); alto (fracciones de 0,3 cm); y picado del tejido. Se llevaron a cabo todos los fraccionamientos con la ayuda de un escalpelo y se procesaron las muestras usando exactamente las mismas condiciones. Se concluyó que los mejores rendimientos, en términos de células totales al final de P0/masa de cordón umbilical/tiempo, se obtuvieron cuando se utilizan fracciones de 2,5 cm. La Tabla 1 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

Tabla 1: Optimización del fraccionamiento: rendimiento celular.

Bajo (5 cm)	Medio (2,5 cm)	Alto (0,3 cm)	Picado
+	++	+	-
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio			

Ejemplo 2: Optimización relativa a la presencia o ausencia de coágulos de sangre en vasos del cordón umbilical (1 vena y 2 arterias).

Se sabe que la lisis de glóbulos rojos es tóxica, reduciendo la viabilidad celular in vitro. Por tanto, se compararon los rendimientos celulares cuando se llevó a cabo la digestión en presencia o ausencia de coágulos de sangre. Para el último experimento, se retiraron los coágulos de sangre con la ayuda de un escalpelo. Se concluyó que los coágulos de sangre tenían efecto negativo en el rendimiento, en términos de células totales y al fin de p0/masa de cordón

umbilical/tiempo. La Tabla 2 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

Tabla 2: Coágulos de sangre; efectos en el rendimiento celular.

Presencia	Ausencia
-	+
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio	

Ejemplo 3: Optimización relativa a la naturaleza enzimática, acción de la enzima individual o combinada, y concentración de la enzima en la solución de digestión.

A fin de maximizar los rendimientos, en términos del número de células con las características deseadas aisladas del tejido inicial, se adoptaron dos soluciones iniciales relacionadas con la digestión de la enzima: adhesión celular directa al matraz de cultivo, en presencia de medio de cultivo, sin digestión, y por tanto, en ausencia de enzimas; y disociación del tejido con una única enzima: 0,075 % (p/v) de collagenasa II o 2,0 % (p/v) de pronasa.

Como la utilización de la collagenasa II sola fue la solución más eficaz, esta enzima se combinó a continuación con otras enzimas, específicamente con Tripsina al 0,125 % (p/v) (en presencia o ausencia de EDTA 0,260 mM) con hialuronidasa al 0,5 % (p/v) sola, y con hialuronidasa al 0,5 % (p/v), combinadas con pronasa al 2,0 % (p/v).

Para estos ensayos, se usó el tamaño óptimo de la fracción de 2.5 cm y la proporción de masa de tejido (g), área superficial de la parte inferior del matraz (cm²), el volumen de la digestión (ml) y el volumen total del matraz (ml), de aproximadamente 1:2:2:37 se mantuvieron constantes.

Los resultados mostraron que los mejores rendimientos, en términos de células totales al fin de P0/masa del cordón umbilical/tiempo, se obtuvieron mediante la acción combinada de collagenasa II al 0,075 % (p/v) con tripsina al 0,125 % (p/v). Además, cuando se cambió la concentración de collagenasa II (0,0375 %, 0,075 % y 0,15 % p/v), manteniendo una concentración de tripsina de 0,125 % (p/v), en presencia de 0,260 mM de EDTA, se confirmó que la concentración de collagenasa II de 0,075 % (w/v) proporcionó el mejor resultado. La Tabla 3 resume cualitativamente estos resultados.

Tabla 3: Naturaleza de la enzima, acción y concentración combinadas: efectos sobre el rendimiento celular

	Sin enzima	Pronasa (2,0 %)	Col II (0,0375 %)	Col II (0,075 %)	Col II (0,150 %)
Sin enzima	0	--	-	+	--
Tripsina (0,125 %)	X	X	+	++	--
Tripsina (0,125 %) + EDTA (0,260 mM)	X	X	X	+++	X
Hialuronidasa (0,5 %)	X	X	X	X	X
Pronasa (2,0 %)+Hialuronidasa (0,5 %)	X	X	X	X	X
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio					

Ejemplo 4: optimización de la composición química de la solución enzimática.

Se ensayaron algunas composiciones de la solución de digestión enzimática, concretamente Alpha-Mem suplementado con 20 % de FBS y 1 % Penicilina/estreptomicina; solución salina tamponada, por ejemplo, HBSS, suplementada con EDTA, más específicamente con 186 mg/ml de CaCl₂, 2H₂O, 400 mg/ml de KCl, 60 mg/ml de K₂HPO₄, 200 mg/ml de MgSO₄ · 7H₂O, 8000 mg/ml de NaCl, 350 mg/ml de NaHCO₃, 90 mg/ml de NaH₂PO₄ · 7H₂O, 1000 mg/ml de glucosa, y 76 mg/ml (0,260 mM) de EDTA; la solución HBSS previa suplementada con 5 mM de CaCl₂; tampón HEPES 25 mM suplementado con CaCl₂ 5 mM.

Para estos ensayos, se mantuvieron las condiciones previamente optimizadas, concretamente, la combinación enzimática consistente en collagenasa II al 0,075 % (p/v) y tripsina al 0,125 % (p/v).

Se obtuvieron los mejores resultados para la solución salina tamponada (HBSS) suplementada con 0,260 mM de EDTA. La Tabla 4 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

Tabla 4: Composición de la solución enzimática: efectos sobre el rendimiento celular.

	Alpha-Mem + 20 % de FBS 1 % de pen/estrep	HBSS + 0,26 mM de EDTA	HBSS + 5 mM de CaCl ₂	25 mM de HEPES + 5 mM + CaCl ₂
Col II (0,075 %) + Trypsina (0,125 %)	--	++	-	+
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio				

5 Ejemplo 5: Optimización del tiempo de incubación de la digestión enzimática y evolución del pH.

Se analizaron diferentes periodos de incubación: 2 h, 4 h, 6 h y 16 h. De los resultados obtenidos el mejor periodo de incubación fue de 4 h. Aunque se observaron digestiones más completas a las 16 h, se descubrió que periodos más prolongados tienen un impacto negativo sobre la viabilidad celular y conducen a una acidificación significativa del medio. La Tabla 5 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

10 Tabla 5: Tiempo de incubación y pH de la solución de digestión enzimática: efectos sobre el rendimiento celular.

	2 h	4 h	6 h	16 h
Col II (0,075 %) + Trypsina (0,125 %) en HBSS + EDTA 0,26 mM	+(pH 6,9)	++(pH 6,4)	-(pH 6,1)	+(pH 5,9)
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio				

Ejemplo 6: Optimización del modo de agitación (moderado vs. intenso) durante la digestión.

15 La incubación de la solución de digestión enzimática se llevó a cabo en un baño de agua con agitación orbital con velocidades de oscilación moderada (100 opm) o intensa (140 opm). La agitación moderada de 100 opm produjo mejores resultados en términos de rendimiento celular. La Tabla 6 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

Tabla 6: Velocidad de agitación: efectos sobre el rendimiento celular.

100 opm	140 opm
++	+
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio	

Ejemplo 7: Optimización de la atmósfera de incubación durante la digestión enzimática (seca vs. húmeda).

20 La incubación de la solución de digestión enzimática se llevó a cabo a 37 °C en dos entornos diferentes: húmedo y seco. Para las muestras del tejido de ensayo se procesaron en paralelo tanto en un agitador orbital imMersed, donde el intercambio de calor se produjo a través de agua y aire saturado, o en una cámara seca, donde el intercambio de calor se produjo a través de aire seco. La incubación en la cámara seca dio como resultado mejores rendimientos celulares. La Tabla 7 resume los resultados de obtenidos cualitativamente.

25 Tabla 7: Ambiente de incubación: efectos sobre el rendimiento celular.

Baño de agua	Cámara seca
++	+++
Clave: +++ = Excelente, ++ = muy bueno, + = bueno, - = razonable, -- = malo, 0 = insatisfactorio	

Ejemplo 8: Optimización de la densidad celular durante la criopreservación.

Para evaluar el efecto de la densidad celular sobre la recuperación celular después de la criopreservación, las células se congelaron al final de P1 en la fase vapor de nitrógeno líquido, a diferentes densidades comprendidas entre 1×10^6 y 10×10^6 células/ml, en criotubos de 1,5 ml que contienen 0,5 ml de suspensión celular y el mismo volumen de una solución compuesta de FBS (90 %) y DMSO (10 %).

- 5 Las células se criopreservaron durante un mínimo de 30 días y a continuación se descongelaron introduciendo el criotubo en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo previamente calentado a 37 °C. Se contaron las células totales y las células viables, que posteriormente se inocularon en frascos de cultivo de tejido (NUNC) a un factor de dilución de 1:10.

Después de 24 h, el medio se intercambió por medio fresco y las células se mantuvieron como se ha descrito anteriormente.

- 10 Para determinar la densidad celular óptima para la criopreservación, la viabilidad celular tras la descongelación (células viables/células totales) y la recuperación celular (células viables tras la descongelación/células viables contadas antes de la criopreservación) se determinaron para cada condición. Los resultados obtenidos muestran que una densidad celular de 3×10^6 células/ml era la más adecuada para garantizar un adecuado mantenimiento y recuperación de células viables después de la criopreservación en las condiciones del ensayo (criotubos de 1,5 ml que contenían 1 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio vacío).

La capacidad de expansión in vitro de las células descongeladas se controló. Las células mostraron típicamente un factor de duplicación de 1,7 duplicaciones diarias, similar al valor observado antes de la criopreservación (Fig. 4).

20 **Ejemplo 9: Aislamiento de células precursoras a partir de cordones umbilicales humanos usando el método desarrollado.**

- 25 Tras obtener la autorización de los Comités de ética de las instituciones donde se recogían los cordones umbilicales, y tras obtener el consentimiento informado de las madres, se recogieron varios cordones umbilicales después de dar a luz. Los cordones umbilicales se separaron de la placenta, se les extrajo toda la sangre, y se transportaron a las instalaciones del laboratorio en un recipiente cerrado estéril que contenía una solución salina estéril, HBSS, suplementada con nutrientes y antibióticos, por ejemplo, 1 g/l de glucosa, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. El transporte hasta las instalaciones se realizó a temperatura ambiente. El método se realizó en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar.

Cada cordón umbilical se lavó 3 veces con solución salina tamponada de Hank (HBSS) y la membrana amniótica que rodea el cordón umbilical se retiró con unas pinzas estériles.

- 30 Cada cordón umbilical se cortó transversalmente con la ayuda de un escalpelo en fracciones de 2,5 cm. Teniendo en cuenta la densidad lineal promedio del cordón umbilical humano (1 g/cm), cada fracción corresponde a aproximadamente 2,5 g de tejido. En dichas fracciones, los coágulos de sangre identificados se eliminaron con la ayuda de un escalpelo. Cada grupo de siete fracciones de 2,5 g exentas de coágulos se trató por separado.

- 35 Se obtuvieron células a partir de la disociación de cada grupo de 7 fracciones, realizada en un frasco estéril y precintado que contenga una solución de digestión de pH tamponado, mediante la acción combinada de collagenasa II, a una concentración del 0,075 % (peso/volumen total de digestión), con tripsina, a una concentración del 0,125 % (peso/volumen total de digestión), manteniendo una relación constante entre la masa de tejido, el área superficial del fondo del frasco, el volumen de digestión y el volumen total del frasco, de aproximadamente 1:2:2:37. El frasco se incubó en condiciones definidas de periodo de tiempo, temperatura, entorno de calefacción, humedad ambiental y agitación; más específicamente, partiendo de un grupo de 7 fracciones de cordón umbilical, cada una de aproximadamente 2,5 g, exentas de coágulos sanguíneos, usando un volumen de solución de digestión de 35 ml, en un matraz de cultivo cerrado no venteado, tal como un T175 con un volumen total de 650 ml y un espacio vacío durante la digestión de 615 ml menos la parte sumergida de las 7 fracciones durante la digestión, y donde la solución de digestión se compone, excluyendo las enzimas, de 186 mg/ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/ml de KCl, 40 mg/ml de K_2HPO_4 , 200 mg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 mg/ml de NaCl, 350 mg/ml de NaHCO_3 , 90 mg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 mg/ml de glucosa, y 76 mg/ml (0,260 mM) de EDTA, manteniendo el pH a 6,4 o superior. La reacción enzimática se incubó durante 4 h, a una temperatura constante de 37 °C en una incubadora cerrada seca, con agitación a una velocidad constante de 100 oscilaciones.min⁻¹ (opm). La recuperación de las células obtenidas a partir de la disociación del tejido se realizó en tres fases.

- 50 En una primera fase, las células se recuperaron a partir del tejido disociado, más específicamente a partir de una incubación horizontal estática del frasco donde tuvo lugar la digestión durante un periodo de tiempo de 5 a 300 minutos, preferentemente de 30 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante de la digestión se transfirió mediante pipeteo, evitando el tejido sin digerir, a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se descartó todo el tejido sin digerir. En este punto, 35 ml de medio de cultivo base suplementado con desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos,

glutamina, antibióticos y suero de feto de ternera (FBS) al 10 % se añadieron al matraz de digestión. El tapón no ventilado del frasco se sustituyó por un filtro que contenía un tapón ventilado, y el matraz de digestión se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 7 % de CO₂. Se realizaron cambios en el medio de cultivo total cada 72 h durante 7 días para estimular el crecimiento de las células que se habían adherido durante la incubación horizontal, hasta que se consiguió una superficie de confluencia de las células.

En una segunda fase de recuperación, las células se recuperaron de la centrifugación del tubo de centrífuga de 50 ml anterior a 350 g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y transfiriendo un volumen de sobrenadante de 35 ml tras la centrifugación a un matraz de cultivo estático, tal como un T₁₇₅ provisto de filtro que contenía un tapón ventilado; añadir al mismo matraz de cultivo 35 ml de medio de cultivo base suplementado con desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos y suero de feto de ternera (FBS) al 10 %; incubar el matraz de cultivo a 37 °C, en una atmósfera humidificada que contenía un 7 % de CO₂; y cambiar el medio de cultivo cada 72 h para estimular la adhesión y la expansión/multiplicación celular hasta obtener la máxima confluencia.

Las poblaciones de células obtenidas a partir de la primera y la segunda fases se criopreservaron al final del primer ciclo de expansión (final de P0). Esto consistió en la criopreservación directa en la fase vapor de nitrógeno líquido de una mezcla de 0,5 ml de suspensión celular que contenía el número total de células deseado, y el mismo volumen de una solución de suero de feto de ternera (FBS) que contenía un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), para obtener una concentración final de aproximadamente 3x10⁶ células/ml, en un criovial estéril de 1,5 ml que contenía 1,0 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio vacío.

La tercera fase, y última, de la recuperación de las células del tejido disociado consiste en la criopreservación directa del aglomerado celular obtenido mediante centrifugación del sobrenadante de la digestión, usando un congelador de velocidad controlada a una velocidad de descenso de la temperatura de 1 °C.min⁻¹ hasta -80 °C, donde las células se resuspendieron en 2 ml de una solución de feto de ternera (FBS) que contenía un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO), en un criovial estéril de 2,5 ml que contenía 2 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio vacío.

Las células criopreservadas se recuperaron después de 31 días mediante un proceso de descongelación rápida en un baño de agua a 37 °C. Las células se resuspendieron a continuación en medio de cultivo a la misma temperatura con un factor de dilución de 1:10. Se pueden realizar etapas de expansión adicionales usando densidades de inóculo entre 5,0x10³ y 2,0x10⁴ células/cm², con intercambio total del medio cada 72 h. Las células muestran típicamente una tasa de crecimiento de 1,7 duplicaciones diarias para 18 pasos.

Ejemplo 10: Certificación del fenotipo mesenquimal de las células precursoras aisladas.

Más allá de la capacidad de adherirse y proliferar en un medio de cultivo selectivo para células precursoras mesenquimales, las células aisladas se caracterizaron al finalizar P1 mediante citometría de flujo.

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 % al 90 % al final de P1, el medio de cultivo se retiró y la superficie de las células se lavó con tampón fosfato (sin Ca²⁺ y Mg²⁺). Se añadió tripsina al 0,25 %, y en cuanto las células se desprendieron de la superficie del matraz, se añadieron dos volúmenes de medio de cultivo. A continuación, la suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 350 g, y se descartó el sobrenadante. El aglomerado que contenía las células se resuspendió en solución de bloqueo (BSA al 0,2 % en DPBS) para conseguir una concentración celular final comprendida entre 2x10⁶ y 10x10⁶ células/ml. Tras un periodo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de la suspensión celular a cada tubo que contenía los anticuerpos primarios conjugados con un marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC). La suspensión celular se agitó y se incubó en hielo, protegida de la luz, durante 20-40 min. Después de este periodo, se añadieron 1,5 ml de DPBS a cada tubo, las células se resuspendieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 350 g. El sobrenadante se descartó, y el aglomerado que contenía las células se resuspendió en 500 µl de paraformaldehído al 1 %.

La suspensión celular se almacenó a 4 °C hasta uso posterior. La citometría de flujo se llevó a cabo en un instrumento FACScalibur de BD Biosciences con la detección de los antígenos de superficie CD44, CD73, CD90 y CD105 como marcadores positivos de células mesenquimales. Para esto, se utilizaron anticuerpos primarios conjugados con FITC o PE (Fig. 1). Se investigó la presencia de los marcadores negativos, los antígenos de superficie CD14, CD31, CD34 y CD45. Estos son específicos de linajes hematopoyéticos (CD34), monocíticos (CD14), endoteliales (CD31) y panleucocíticos (CD45), y todos estos anticuerpos se conjugaron con FITC (Fig. 2). Como se esperaba, la gran mayoría de las células mesenquimales aisladas mostraron ser positivas para CD44, CD73, CD90 y CD105 y negativas o solo ligeramente positivas para los marcadores negativos anteriormente citados.

Ejemplo 11: Demostración del fenotipo precursor de las células de las células aisladas: diferenciación osteogénica.

De acuerdo con la descripción detallada de la invención, las células precursoras aisladas de las fracciones del cordón umbilical humano muestran la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células especializadas. En este ejemplo se demuestra las capacidades de diferenciación de estas células para dar osteoblastos.

Las células se inocularon en P3 a una densidad de $2,0 \times 10^4$ células/cm² en medio de diferenciación osteogénico que contenía medio base alfa-MEM (con desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y ultraglutamina) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, β -glicerofosfato 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 50 μ g/ml de ascorbato-2-fosfato, 100 nM de dexametasona (Hung *et al.*, 2002).

La totalidad del medio se cambió 2 veces por semana durante 3 semanas, después de local, se llevaron a cabo los protocolos de tinción específica con rojo de alizarina y fosfatasa alcalina, y en ambos casos el resultado fue positivo. Con respecto a la tinción con rojo de alizarina, el medio se aspiró cuidadosamente del matraz de cultivo de tejido, y las células se fijaron con para-formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Las células se lavaron con PBS y se incubaron con la solución de tinción específica, rojo de alizarina S, 40 mM, pH 4,2, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de rojo de alizarina S se eliminó y las células se lavaron cuidadosamente con agua (Kotobuki *et al.*, 2006).

En el caso del ensayo con la fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich), las células también se fijaron con para-formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con PBS y se sumergieron en 2,5 ml de solución de citrato y se dejaron incubar durante 30 segundos.

La solución de citrato se retiró a continuación, y las células se lavaron con agua desionizada (*milliQ*) y se incubaron con la solución de tinción, Rojo neutro, durante 2 minutos. La solución se eliminó a continuación y las células se lavaron cuidadosamente con agua (Shim *et al.*, 2004). El ensayo dio un resultado positivo para la diferenciación osteogénica (Fig. 5).

Ejemplo 12: Demostración del fenotipo precursor de las células de las células aisladas: diferenciación adipogénica.

Para diferenciar las células en adipocitos, las células se sembraron en placas en P3 a una densidad de $2,0 \times 10^4$ células/cm² en medio base alfa-MEM (con desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y ultraglutamina) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin) y se mantuvieron en este medio de cultivo. Al alcanzar la confluencia, el medio se cambió a medio de diferenciación adipogénico compuesto de DMEM-LG con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 10 μ g/ml de insulina, 200 μ M de indometacina, isobutil-1-metilxantina 0,5 mM y dexametasona 1 μ M (Shih *et al.*, 2005).

La totalidad del medio se cambió 2 veces por semana durante 3 semanas, después de lo cual, se llevaron a cabo los ensayos de tinción específica con Oil red O y se confirmó la diferenciación adipogénica. Para esto, el medio de cultivo aspiró cuidadosamente del matraz de cultivo de tejido (NUNC) mediante aspiración y las células se fijaron con para-formaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con la solución filtrada de Oil red Oil (2:3) durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. La solución de Oil red Oil se eliminó a continuación y las células se lavaron cuidadosamente con agua (Do, *et al.*, 2006). El ensayo dio un resultado positivo para la diferenciación adipogénica (Fig. 5).

Ejemplo 13: Demostración del fenotipo precursor de las células de las células aisladas: diferenciación condrogénica.

Para la diferenciación condrogénica, las células se resuspendieron en P3 a una densidad final de $1,1 \times 10^6$ células/ml y se introdujeron en un tubo cónico de 15 ml para dejar que las condroesferas se formaran. El medio de cultivo utilizado fue el medio de diferenciación condrogénica que consiste en DMEM-LG con FBS al 1 %, 6.25 μ g/ml de insulina, 10 ng/ml de TGF β 1 y ascorbato-2-fosfato 50 μ M (Shih *et al.*, 2005).

La totalidad del medio se cambió dos veces a la semana durante 4 semanas, prestando especial atención a no perturbar las condroesferas, después de lo cual, se realizaron los protocolos de tinción específica con azul alcian y hematoxilina, y se confirmó la diferenciación condrogénica. Para ello, la totalidad del medio se retiró del tubo mediante aspiración, y las condroesferas se lavaron con PBS. A continuación, las condroesferas se sumergieron en agar y se congelaron en la fase vapor de nitrógeno líquido.

Con un microtomo, el agar se cortó en cortes de tejido de 5 μ m. Estos cortes se tiñeron con azul alcian al 1 % y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se lavaron con PBS. Las preparaciones

fijadas en un porta de microscopio se pasaron por una solución de hematoxilina y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La hematoxilina se eliminó con una etapa de lavado final con PBS (Okada, *et al.*, 2005). El ensayo dio un resultado positivo para la diferenciación condrogénica (Fig. 5).

Ejemplo 14: Demostración del fenotipo precursor de las células de las células aisladas: diferenciación cardiomiogénica.

La diferenciación cardiomiogénica se realizó durante un periodo de 18 días, durante el cual, se utilizaron diferentes medios de cultivo (Lee *et al.*, 2004). Las células se sembraron a una densidad de 3000 células/cm² en un porta con una cámara de 16 pocillos revestidos con ornitina. Las células se sembraron en medio Medio C0 compuesto por medio base alfa-MEM (con desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y ultraglutamina) suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Veinticuatro horas después de la siembra, el medio de cultivo se sustituyó por otro medio (Medio C1) compuesto por DMEM-LG suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, 10 ng/ml de β-FGF y 5-azacitidina 10 µM. Veinticuatro horas después de sembrar las células en placas con Medio C1, se realizó un segundo cambio de medio a Medio C2. El Medio C2 consistió en medio base de DMEM-LG suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM y 10 ng/ml de β-FGF. Las células se mantuvieron en Medio C2 durante dos semanas con cambios de medio cada 72 horas.

En paralelo, se sembraron células de control (no diferenciadas) a una densidad de 5000 células/cm² y se mantuvieron en Medio 0. Tras el periodo de diferenciación, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra una proteína muscular típica, la troponina cardiaca T, específica de cardiomiocitos. Para localizar células para el ensayo, los núcleos celulares se tiñeron con un fluorocromo, DAPI, específico de ácidos nucleicos. Como se esperaba, solamente las células sometidas al protocolo de diferenciación cardiomiogénico, que ya presentaban la morfología típica de los cardiomiocitos, produjeron una señal fluorescente (Fig. 6D).

Ejemplo 15: Demostración del fenotipo precursor de las células de las células aisladas: diferenciación neurogénica/glial:

La diferenciación neurogénica se realizó durante un periodo de 12 días, durante el cual, se utilizaron diferentes medios de cultivo (Lee *et al.*, 2004). Las células se sembraron a una densidad de 3000 células/cm² en portas con una cámara de 16 pocillos revestidos con ornitina. Las células se sembraron en medio de cultivo (Medio N1), compuesto por medio base IMDM suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM (Sigma), 5 ng/ml de β-FGF, ácido retinoico 0,5 µM y 2-mercaptoetanol 1 mM.

Tres días después de la siembra, N1 se sustituyó por Medio N2 que contenía medio base IMDM suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, monofosfato de adenosina cíclico 1 mM (AMPc) y ascorbato-2-fosfato 100 µM.

Tres días después de la siembra, N2 se sustituyó por Medio N3 que contenía medio base IMDM suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, monofosfato de adenosina cíclico 1 mM (AMPc) e hidrocortisona 10 µM.

Finalmente, tres días después de la siembra, N3 se sustituyó por Medio N4 que contenía medio base IMDM suplementado con FBS al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, 20 ng/ml de FGF-1, 10 ng/ml de SHH, 10 ng/ml de NGF, 25 ng/ml de vitronectina, ascorbato-2-fosfato 100 µM, isobutilmetilxantina 100 µM, forskolina 10 µM y PMA 20 nM.

En paralelo, se sembraron células de control (no diferenciadas) a una densidad de 5000 células/cm² y se mantuvieron en Medio N0 (véase el protocolo de diferenciación cardiomiogénica).

Tras el periodo de diferenciación, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo primario dirigido contra β-tubulina, tipo III, específico de células neuronales. Para localizar las células para el ensayo, los núcleos celulares se tiñeron con un fluorocromo, DAPI, específico de ácidos nucleicos. Como se esperaba, solamente las células sometidas al protocolo de diferenciación neurogénica/glial, que ya presentaban la morfología típica glial (Fig. 7B) produjeron una señal fluorescente (Fig. 7D).

Referencias

Auger F. A., Germain L., Remy-Zolghadri M. y C. J. Hayward (2005). Method of isolating cells from umbilical cord. WO 2005001081.

Barry F. P. y J. M. Murphy (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36:568-584.

- Can A. y S. Karahuseyinoglu (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* (on line - www.StemCells.com); DOI:10.1634/stemcells.2007-0417.
- Carvalho A. v., Lima, C., Basto v., Cunha C., Escada P., Cruz P. y H. Cruz (2007). Adult human neuronal stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation. WO 2007020611.
- Claes L., Eckert-Hubner K. y P. Augat (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J. Orthop. Res.* 20:255-266.
- Cullinane D. M., Salisbury K. T., Alkhiary Y., Eisenberg S., Gerstenfeld L. y T. A. Einhorn (2003). Effects of local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development? *J. Exp. Biol.* 206:2459-2471.
- Chul-Won H. A., Yoon-Sun Y. e Y. Sung-Eun (2003) Isolation and culture-expansion methods of mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord blood, and differentiation method of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem/progenitor into various mesenchymal tissues. WO 03070922.
- Davies J. E., Dolores B., Raúl S., Morris H. and A. D. S. Lickorish (2004). Progenitor cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. WO 2004072273.
- Deryl L. T. y M. L. Weiss (2008). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26:591-599.
- Do M., Jeong H., Choi B., Hunter L., Langley S., Pazmany L. y P. Trayhurn (2006). Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF- α -treated SGBS human adipocytes. *Yonsei Medical Journal*, vol. 47, N°5, 729-736.
- Gardner T. N., Stoll T., Marks L., Mishra S. y M. K. Tate (2000). The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissue differentiation in a long bone fracture - a FEM study. *J. Biomech.* 33:415-425.
- Harris I. R., Messina D. J., Kihm A. y A. Seyda (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making and using the same. WO 2006/071794.
- Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H.-L. y W.-H. Lo (2002). Isolation and Characterization of Size-Sieved Stem Cells from Human Bone Marrow. *Stem Cells* 20:249-258
- Kadner A., Zund G., Maurus C., Breymann C., Yakarisik S., Kadner G., Turina M. y S. P. Hoerstrup (2004). Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *European Journal of CardioThoracic Surgery* 25:635-641.
- Kotobuki N., Kawagoe D., Nomura D., Katou Y., Muraki K., Fujimori H., Goto S., Ioku K. y H. Ohgushi (2006). Observation and quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured in vitro on newly formed transparent β -tricalcium phosphate. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 17:33-41.
- Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Lee K. D., Hsieh S. L. y T. H. Chen (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103:1669-1675.
- Majumdar M. K., Thiede M. A. y J. D. Mosca (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol* 176:57-66.
- Lu L -L, Liu Y -J, Yang S -G, Zhao Q -J, Wang X, Gong W, Han Z -B, Xu Z -S, Lu Y -X, Liu D, Chen Z -Z, Han Z -C (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials, *Haematologica* 91:1017-1026
- Mitchell K. E., Weiss M. L., Mitchell B. M., Martin P., Davis D., Morales L., Helwig B., Beerenstrauch M., AbouEasa K., Hildreth T. y D. Troyer (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21:50-60, 2003.
- Nanaev A. K., Kohnen G., Milovanov A. P., Domogatsky S. P. y P. Kaufmann (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 18:53-64.
- Okada A., Shiomi T., Aoki Y. y M. Fujiwara (2005). Phenytoin stimulates chondrogenic differentiation in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5. *J. Toxicol. Sci.*, vol. 30, N° 3, 145-156.

- Phan T. T. y I. J. Lim (2006). Isolation of stem/progenitor cells from amniotic membrane of umbilical cord. WO 2006019357.
- Pittenger M. F., Mackay A. M. y C. B. Beck (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143-147.
- 5 Purchio A. F., Naughton B. A. y J. San Roman (1998). Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly. WO 9817791.
- Roisen F. J., Klueber K. M., Lu C. L., Hatcher L. M., Dozier A., Shields C. B. y S. Maguire (2001) Adult human olfactory stem cells. Brain Res. 890:11-22.
- 10 Romanov Y. A., Svintsitskaya V. A. y V. N. Smirnov (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 21:105-110.
- Seyda A. y A. Gosiewska (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making, culturing, and using the same. WO 2006101548.
- Shih D. T.-B., Lee D.-C., Chen S.-C., Tsai R.-Y., Huang C.-T., Tsai C.-C., Shen E.-Y. y W.-T. Chiu (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. Stem Cells 23:1012-1020.
- 15 Shim W. S. N., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y. L., Tan Y. S., Sin Y. K., Lim C. H., Chua T., Teh M., Liu T. C. y E. Sim (2004). Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem. Biophys. Res. Com. 324:481-488.
- Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C. y C. C. Chen (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the umbilical cord, Stem Cells 22:1330-1337.
- 20 Weiss M L, Medicetty S, Bledsoe A R, Rachakatla R S, Choi M, Merchav S, Luo Y, Rao M S, Velagaleti G Troyer D (2006). Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease, Stem Cells 24:781-792

REIVINDICACIONES

1. Método de selección para aislar células de la matriz del cordón umbilical humano caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Una etapa de recuperación en la que el cordón umbilical humano se transportado a las instalaciones del laboratorio en un recipiente cerrado estéril, bien seco o sumergido en una solución tampón estéril, con o sin antibióticos, que preferentemente contiene 186 µg/ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/ml de KCl, 60 µg/ml de K_2HPO_4 , 200 µg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 µg/ml de NaCl, 350 µg/ml de NaHCO_3 , 90 µg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2000 µg/ml de glucosa, 10 U/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomycin; preferentemente a temperatura ambiente si se procesa en un periodo de 72 h, o entre 2 y 8 °C, preferentemente a 4 °C, si se procesa en un periodo entre 48 y 144 h después de la recogida;
- 10 b) Tres etapas de lavado del cordón umbilical con una solución salina estéril, que contiene preferentemente 186 µg/ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/ml de KCl, 60 µg/ml de K_2HPO_4 , 200 µg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 µg/ml de NaCl, 350 µg/ml de NaHCO_3 , y 90 µg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 15 c) Una etapa de retirada de la membrana amniótica externa, donde la membrana amniótica se retira con la ayuda de pinzas estériles;
- d) Una etapa de fraccionamiento donde el cordón umbilical se fracciona transversalmente a lo largo de su eje longitudinal con ayuda de un escalpelo para producir fracciones de 2,5 cm (2,5 g);
- e) Una etapa de eliminación de coágulos de las fracciones resultantes de d), donde se realizan incisiones, con la ayuda de un escalpelo, en la ubicación donde los coágulos se identifican, y donde los coágulos se eliminan;
- 20 f) Una etapa de agrupamiento donde las fracciones resultantes de e) se reúnen en grupos de 7, que se procesarán de manera independiente en las siguientes etapas;
- 25 g) Una etapa de disociación celular para cada grupo de 7 fracciones, resultantes de f), llevadas a cabo en un matraz estéril y precintado que contiene una solución de digestión con pH tamponado, mediante la acción combinada de la collagenasa II y tripsina, donde la collagenasa II está a una concentración entre 0,0375 % y 0,075 % (peso/volumen de digestión total) y la tripsina está a una concentración de 0,125 % (peso/volumen de digestión total); manteniendo una relación constante entre la masa de tejido (gramos), el área superficial de la parte inferior del matraz (cm^2), volumen de digestión (ml), y el volumen total del matraz (ml), de aproximadamente 1:2:2:37; y donde el matraz se incubaba en condiciones definidas de tiempo de incubación, temperatura, dispersión térmica, humedad ambiente y agitación; más específicamente, comenzando a partir de un grupo de 7 fracciones de cordones umbilicales con aproximadamente 2,5 g cada uno, exento de coágulos de sangre; utilizando un volumen de solución de digestión de 35 ml; en un matraz de cultivo no ventilado y cerrado tal como un T_{175} con un volumen total de 650 ml, y un espacio de cabeza durante la digestión de 615 ml menos el volumen sumergido de las 7 fracciones en digestión; y donde la solución de digestión consiste en, además de enzimas, 186 µg/ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 400 µg/ml de KCl, 60 µg/ml de K_2HPO_4 , 200 µg/ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8000 µg/ml de NaCl, 350 µg/ml de NaHCO_3 , 90 µg/ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000 µg/ml de glucosa, y 76 µM (0,260 mM) de EDTA; manteniendo el pH a 6,4 o superior; y donde la reacción enzimática se incubaba durante un período de 4 h; a una temperatura constante de 37 °C; en una incubadora seca cerrada; con agitación a una velocidad constante de 100 o 140 oscilaciones. min^{-1} (opm); preferentemente 100 opm,
- 30 h) Una primera etapa de recuperación de las células disociadas del tejido, como se describe en g), que se recuperan mediante incubación horizontal estática del matraz cuando la digestión tiene lugar; durante un periodo de tiempo de 5 a 300 minutos, preferentemente de 30 minutos; a temperatura ambiente; seguido por transferencia del sobrenadante de la digestión por medio de pipeteado, evitando la succión de cualquier tejido sin digerir, a un tubo de centrífuga de 50 ml; que a su vez va seguida de la eliminación de todo el tejido sin digerir del matraz de digestión; al que se añaden 35 ml de medio de cultivo basal suplementado con desoxirribonucleasas, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos y 10 % de suero de feto bovino (FBS) y antibióticos; y en el que el tapón del matraz no venteado se sustituyó por un filtro que contenía un tapón venteado; seguido por incubación a 37 °C, en una atmósfera humidificada que contenía un 7 % de CO_2 ; con cambios del medio de cultivo cada 72 h para estimular la adhesión y el crecimiento/multiplicación celular hasta obtener la máxima confluencia en la superficie;
- 40 i) Una segunda etapa de recuperación de células, donde las células disociadas del tejido, como se describe en g) y contenidas en el sobrenadante de centrifugación obtenido como se describe en h) se recuperan mediante centrifugación del tubo de centrífuga de 50 ml de h) a 350 g, durante 10 minutos a temperatura ambiente; transferir 35 ml de volumen de sobrenadante tras la centrifugación a un matraz de cultivo estático (T_{175}) con un filtro que contenía un tapón venteado; añadir al mismo matraz de cultivo 35 ml de medio de cultivo base suplementado con desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, glutamina, antibióticos y suero de feto de ternera (FBS) al 10 % y antibióticos; incubar el matraz de cultivo a 37 °C, en una atmósfera humidificada que contenía un 7 % de CO_2 ; y
- 50

cambiar el medio de cultivo cada 72 h para estimular la adhesión y el crecimiento/multiplicación celular hasta obtener la máxima confluencia en la superficie;

- 5 j) Una tercera etapa de recuperación donde las células disociadas del tejido, como se describe en g) se recuperan como aglomerado celular obtenido mediante la centrifugación del sobrenadante de la digestión como se describe en i), resuspendido en 2 ml de una solución que consiste en suero de feto bovino (FBS), y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10 %, y criopreservación directa utilizando un congelador de velocidad controlada con una velocidad de disminución de la temperatura de $1\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, hasta $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un criovial estéril de 2,5 ml que contiene 2 ml de suspensión celular y 0,5 ml de espacio vacío;
- 10 k) Una etapa de criopreservación de las poblaciones de células originadas como se describe en h) e i), después que los cultivos celulares alcanzan la máxima confluencia de la superficie, que consiste en la crioconservación directa en la fase de vapor de nitrógeno líquido de una mezcla de 0,5 ml de suspensión celular y 0,5 ml de una solución de suero de feto bovino (FBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %, de tal forma que la densidad celular final después de la criopreservación es de aproximadamente 3×10^6 célula/ml, en un criovial estéril de 1,5 ml, que contiene el 1,0 ml final de la suspensión celular y 0,5 ml de espacio vacío.
- 15 2. El método de selección de acuerdo con la reivindicación anterior, en el que el rendimiento, al final del primer ciclo de expansión y de adherencia (P0), es de aproximadamente $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$ células por gramo de cordón umbilical.
3. El método de selección descrito en las reivindicaciones 1-2 para la fabricación o producción de composiciones de terapia celular.
4. El método de selección descrito en la reivindicación 3, en el que la terapia es autóloga.
- 20 5. El método de selección descrito en las reivindicaciones 1-2 para su uso en la producción de capas celulares en soportes de cultivo celular.
6. El método de selección descrito en las reivindicaciones 1-2 para la creación de bancos de células.

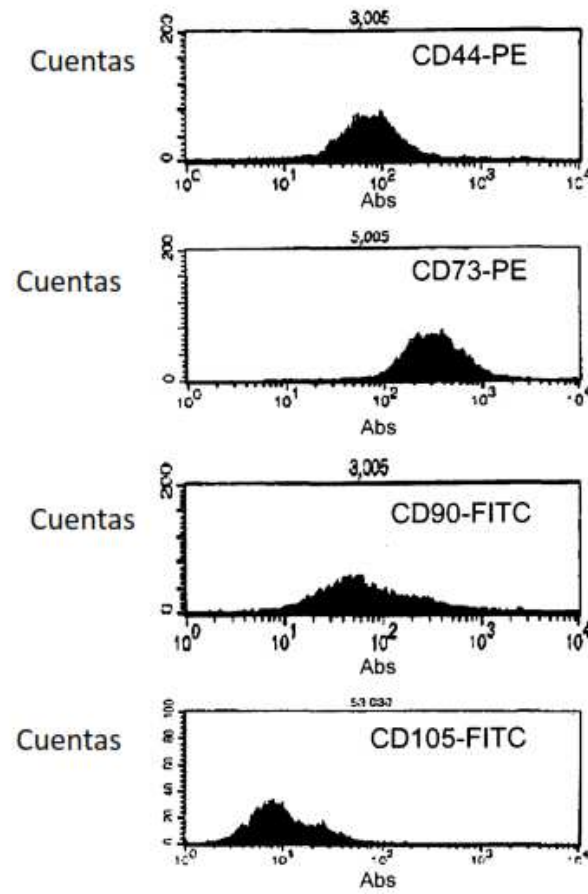


Figura 1

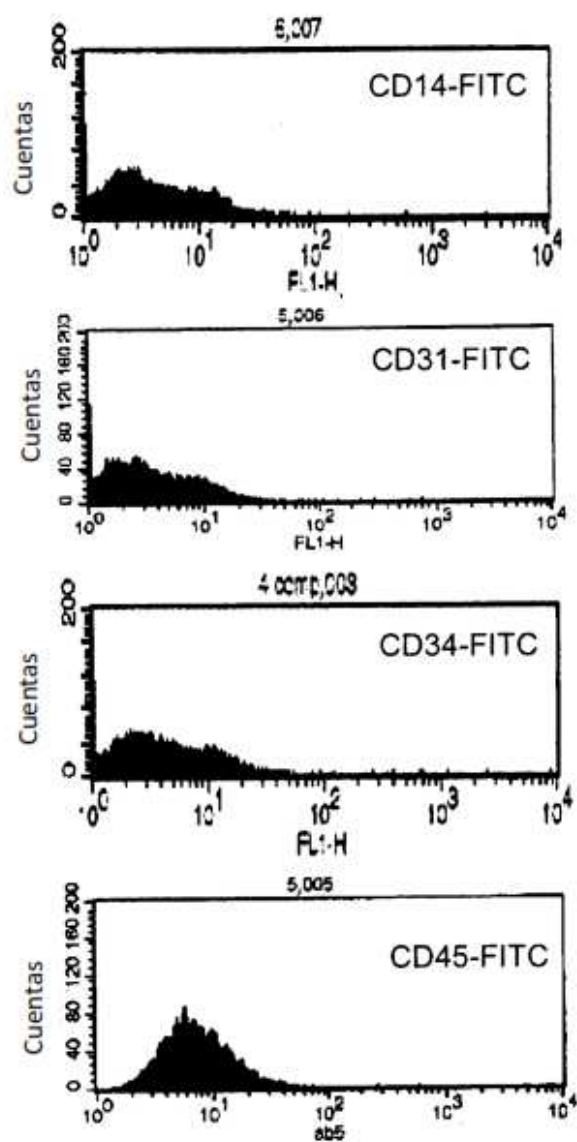


Figura 2

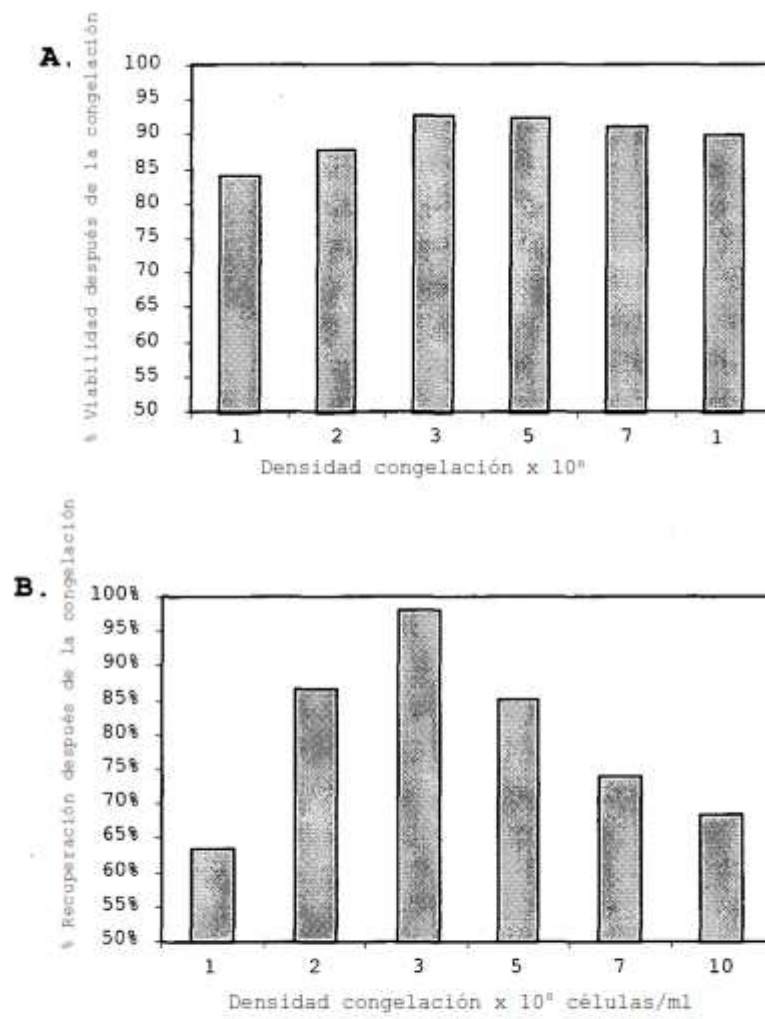
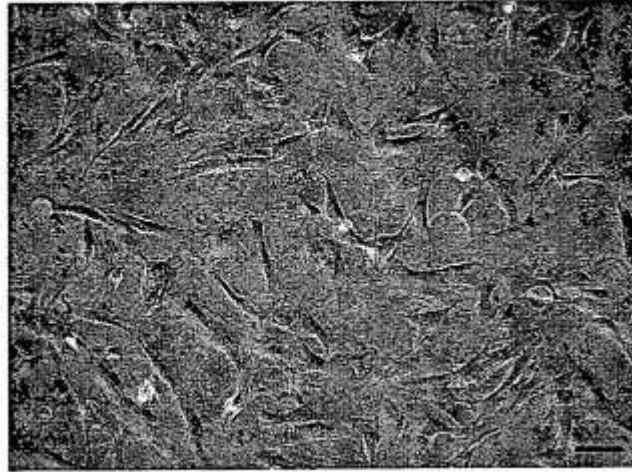


Figura 3

A.



B.

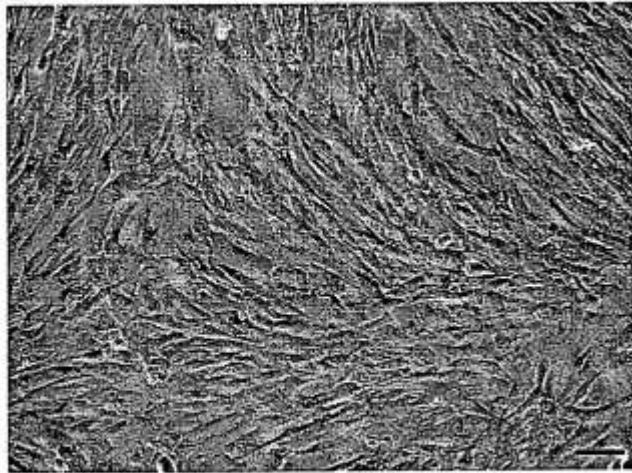


Figura 4

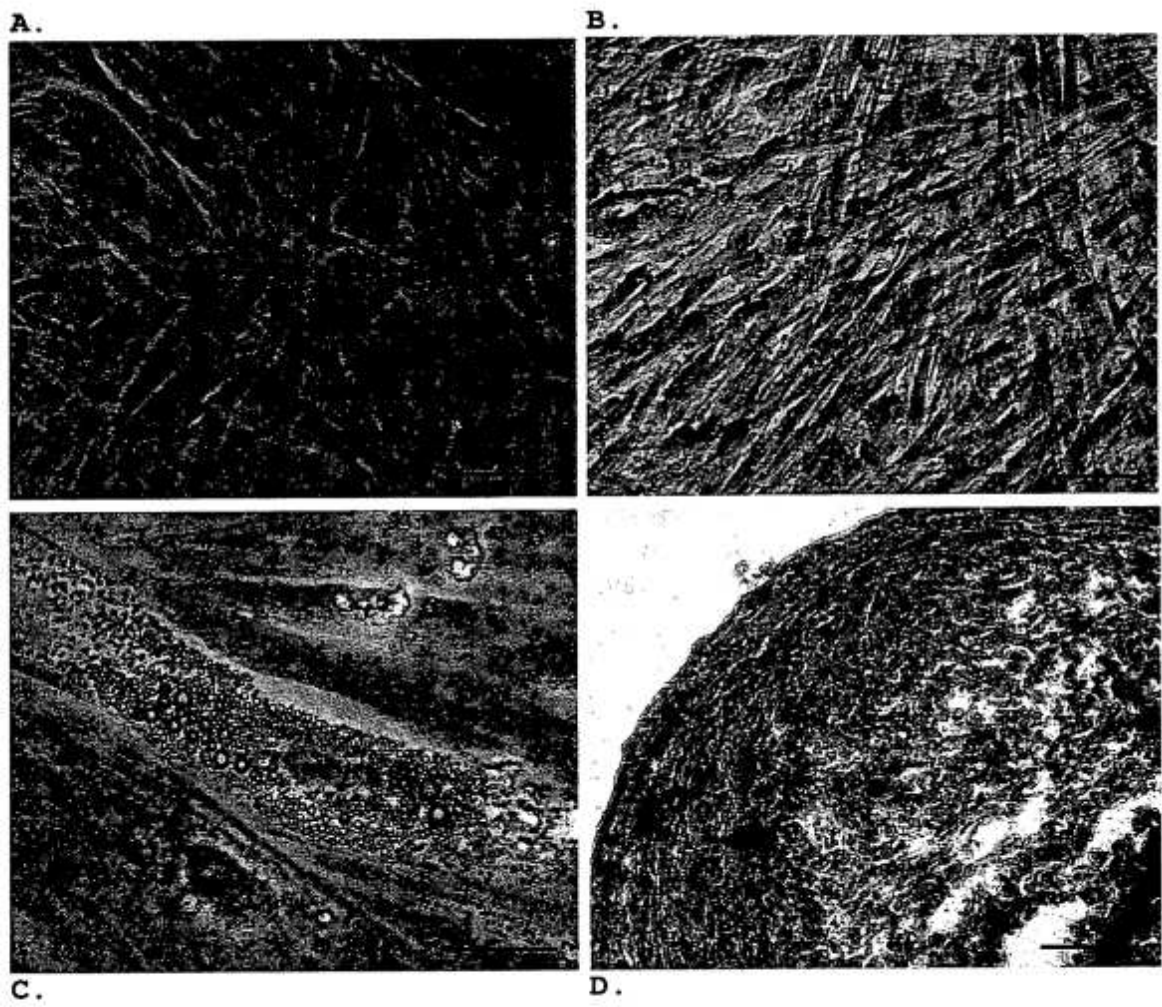


Figura 5

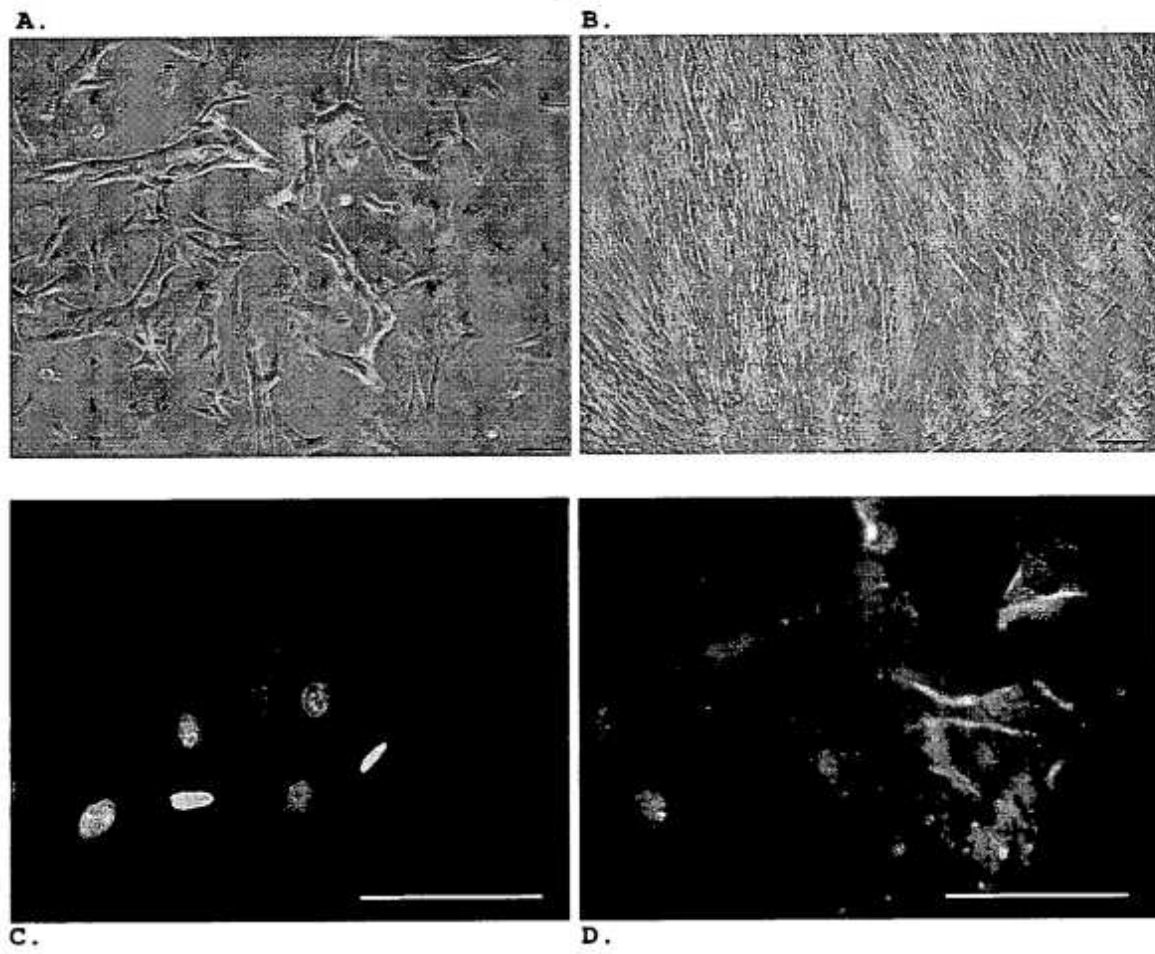


Figura 6

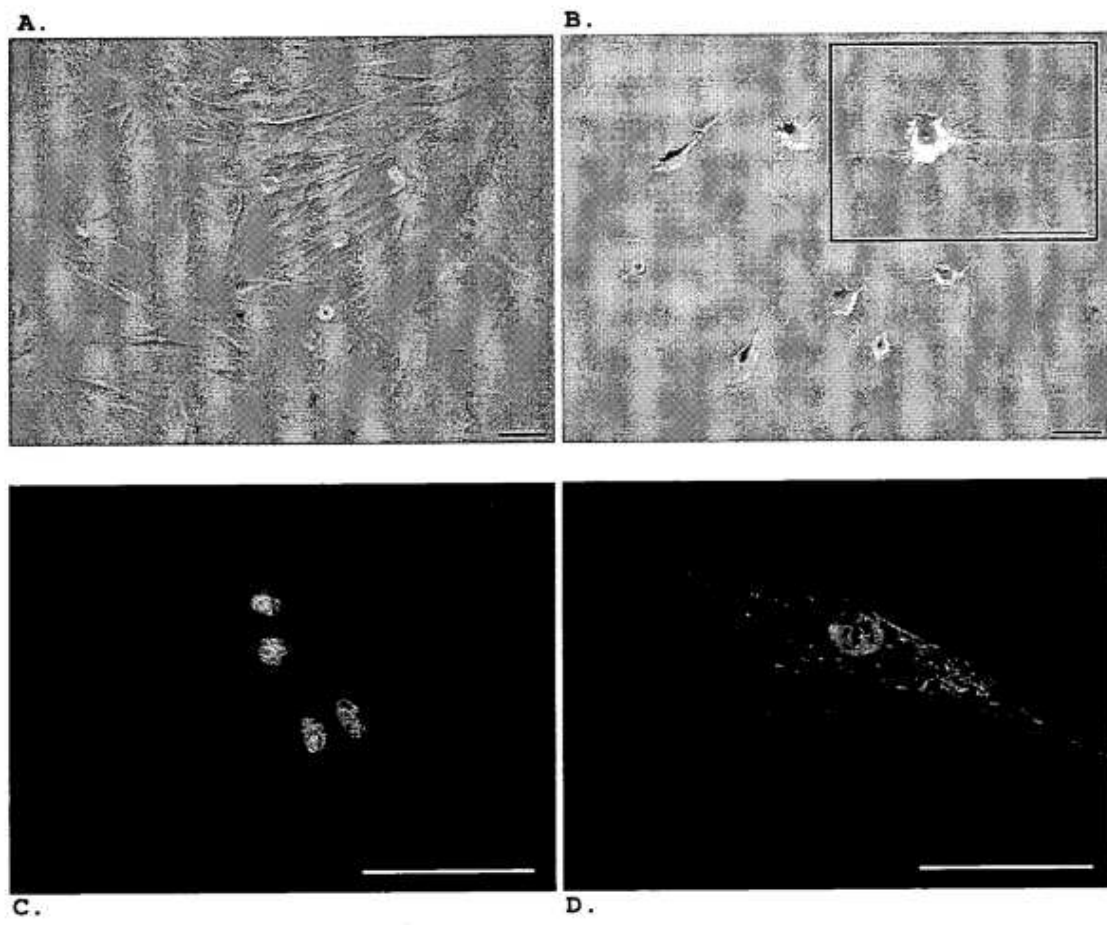


Figura 7