

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 545**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00	(2006.01)
C12N 5/073	(2010.01)
A61K 35/51	(2015.01)
C12N 5/07	(2010.01)
A61L 27/38	(2006.01)
C12N 5/0775	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011 PCT/US2011/038710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11153205**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11725570 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2576768**

54 Título: **Células madre nativas de la gelatina de Wharton y su purificación**

30 Prioridad:

01.06.2010 US 350303 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2017

73 Titular/es:

**AUXOCELL LABORATORIES, INC. (100.0%)
245 First Street, Suite 1800
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

TAGHIZADEH, ROUZBEH R.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 634 545 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

Células madre nativas de la gelatina de Wharton y su purificación

5 REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El tejido del cordón umbilical es rico en células madre. La sangre del cordón umbilical incluye células madre, que incluyen células madre hematopoyéticas que se pueden usar para repoblar la sangre de una persona y el sistema inmunológico. La gelatina de Wharton, una sustancia gelatinosa dentro del cordón umbilical, contiene una población adicional de células madre, distintas de las encontradas en la sangre del cordón. Como se usa en el presente documento, la "gelatina de Wharton" puede incluir además la capa amniótica epitelial del cordón umbilical. El procesamiento y el cultivo de la gelatina de Wharton permite el aislamiento de la células madre mesenquimales que se pueden usar para regenerar una variedad de tejidos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5,919,702).

RESUMEN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que el proceso de cultivo de células a partir de la gelatina de Wharton cambia sustancialmente las características de las células. En comparación con una población de células cultivadas *in vitro*, las células de la gelatina de Wharton sin cultivar son molecularmente diferentes como se puede observar, por ejemplo, en un perfil molecular diferente en su superficie celular. Más importante aún, los inventores han descubierto que las células de la gelatina de Wharton mínimamente manipuladas son sustancialmente más potentes *in vivo* que las células de la gelatina de Wharton cultivadas.

Los inventores han desarrollado un procedimiento para purificar células madre a partir de la gelatina de Wharton sin necesidad de un paso de cultivo. De acuerdo con la presente invención, el procedimiento incluye la separación de células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar a partir de un tejido digerido que incluye la gelatina de Wharton, un paso anterior de digestión del tejido triturando mecánicamente el tejido, y un anterior para digerir el tejido que incluye la gelatina de Wharton, el tejido se seca para eliminar las arterias y venas.

La digestión incompleta puede dejar fragmentos de tejido sin digerir. El procedimiento incluye la separación del tejido digerido y sin digerir, como por ejemplo sedimentando el tejido sin digerir. El procedimiento de sedimentación se acelera, por ejemplo, por centrifugación. El tejido digerido se filtra para eliminar el tejido sin digerir, las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar se pueden separar del filtrado, por ejemplo mediante sedimentación o filtración. El tejido digerido, que puede ser viscoso, se lava o diluye antes de un paso de separación, aunque otros pasos como por ejemplo la centrifugación vigorosa pueden ser eficaces incluso en ausencia de un paso de lavado o dilución.

Además, los inventores han desarrollado procedimientos de recuperación de células madre cultivadas y no cultivadas a partir de la gelatina de Wharton. El procedimiento incluye células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar purificadas de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, y células madre mesenquimales cultivadas a partir del tejido sin digerir. De este modo, se obtienen células madre sin cultivar de potencia superior a partir del tejido digerido y las células adicionales se cultivan a partir de restos del tejido sin digerir. Las células madre mesenquimales se cultivan opcionalmente en un medio que incluye la gelatina de Wharton.

Además la invención se refiere a la células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar purificadas y su uso. Como se usa en el presente documento, "purificado" indica que se han aislado y separado células madre de la gelatina de Wharton a partir de ciertos componentes acelulares de la gelatina de Wharton, pero no se indica que las células madre se hayan purificado necesariamente a partir de otros tipos de células que además puedan estar presentes en la gelatina de Wharton. En algunas formas de realización, las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar purificadas carecen sustancialmente de gelatina de Wharton semi-sólida. Pueden quedar algunos grados de gelatina de Wharton licuada (digeridos en un líquido viscoso, por ejemplo), o las células pueden carecer completamente de gelatina de Wharton y opcionalmente en otro medio, como por ejemplo una solución estéril, una solución salina equilibrada, una solución crioprotectora, plasma, etc. En otras formas de realización, las células madre de la gelatina de Wharton se mantienen a una temperatura inferior a 0 °C, inferior a -20 °C, inferior a -80 °C, o inferior a -180 °C, por ejemplo en un vial, bolsa, u otro recipiente adecuado a dicha temperatura. Las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar purificadas de la invención pueden diferir sustancialmente de las células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton, incluyendo diferencias en el nivel de la expresión de la superficie celular de una (o dos o tres o cuatro o más) de CD49B, CD105, CD133, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29, y/o

CD90. En algunas formas de realización, por ejemplo, la población de células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar tienen niveles reducidos de la expresión de la superficie celular de CD73 y CD105 en comparación con las células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton. Se ha informado que tanto CD73 como CD105 son marcadores de células madre mesenquimales. En consecuencia, el nivel reducido de CD73 y CD105 en las superficies celulares de las células madre de la gelatina de Wharton es homogéneo con la identificación de estas células como sustancialmente diferente de las células madre mesenquimales cultivadas.

Las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar son multipotentes y se pueden administrar a un sujeto como parte de un procedimiento terapéutico, por ejemplo, para curar un tejido o para ayudar en la regeneración de tejidos.

10 En ciertas formas de realización, las células madre de la gelatina de Wharton son ventajosamente autólogas o alogénicas al sujeto.

También se desvela en esta invención una solución homogénea que incluye la gelatina de Wharton. La solución se puede obtener, por ejemplo, digiriendo la gelatina de Wharton para obtener un líquido viscoso y purificar partículas, como por ejemplo tejido o células sin digerir, a partir de lo digerido para obtener una solución homogénea. La solución se puede diluir opcionalmente, como por ejemplo mediante una solución salina equilibrada u otra solución estéril, para reducir la viscosidad. La solución puede reducir el número de células, eliminando sustancialmente todas las células o de otra forma reduciendo el número de células en la solución. La solución se puede congelar (por ejemplo, a una temperatura de -20 °C o inferior), y se puede usar opcionalmente en un proceso de cultivo celular.

20 Por lo tanto, la invención proporciona además procedimientos de mantenimiento de una célula mezclando la célula en una solución homogénea incluyendo la gelatina de Wharton, por ejemplo añadiendo la célula a la solución, añadiendo la solución a una suspensión que comprende la célula, o aplicando la solución a una superficie a la que está adherida la célula. La célula se puede cultivar *in vitro*. En una forma de realización, la célula es una célula madre multipotente, como por ejemplo una célula madre mesenquimal de la gelatina de Wharton.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Otras características y ventajas de la presente invención, así como la invención en sí, pueden comprenderse más plenamente a partir de la siguiente descripción de varias formas de realización, cuando se leen junto con los dibujos adjuntos, en las que:

La FIG. 1 describe gráficamente la eficacia *in vivo* de células madres de la gelatina de Wharton (CMM GW) no cultivadas o de células mesenquimales expandidas en cultivo (CMM GW expandidas) en un ensayo de cotrasplante con células madre hematopoyéticas humanas de sangre de cordón umbilical, con los resultados mostrados como porcentaje (%) de las células de la médula ósea que expresan CD45 humano en su superficie, que sirve como un marcador sustituto del injerto de las células humanas trasplantadas en ratón;

La FIG. 2 representa gráficamente, para cada trece marcadores de superficie celular (CD49B, CD105, CD34, CD45, CD133, HLA-ABC, CD73, HLA-DR, CD14, CD44, SSEA-4, CD29 y CD90), en dos dimensiones el número de células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar medidas para tener un nivel de expresión particular de marcador de la superficie celular, y

La FIG. 3 es una representación gráfica comparable al número de células madre mesenquimales expandidas por cultivo a partir de la gelatina de Wharton que tienen un nivel de expresión particular del marcador en la superficie celular.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente aplicación proporciona procedimientos para purificar las células madre de la gelatina de Wharton sin necesidad de un paso de cultivo. Las células resultantes son particularmente útiles terapéuticamente, teniendo potencia superior en comparación con las células madre expandidas en cultivo a partir de la gelatina de Wharton. La aplicación proporciona además una solución homogénea a partir de la gelatina de Wharton que se puede usar, por ejemplo, en un proceso de mantenimiento de las células, como por ejemplo en cultivo.

Para proporcionar una comprensión completa de la invención, se describirán ahora ciertas formas de realización ilustrativas.

55 Purificación de las células madre de la gelatina de Wharton

La purificación de las células madre de la gelatina de Wharton requiere separar las células sin cultivar del tejido digerido que incluye la gelatina de Wharton. El tejido del cordón umbilical se puede diseccionar para eliminar las arterias y venas, y después procesar para maximizar el área de superficie disponible. Este proceso puede

generalmente involucrar cualquier forma de aumento mecánico del área de superficie del tejido, pero más a menudo involucra cortar finamente o triturar microscópicamente el tejido en pequeñas cadenas de hebras microscópicas, como por ejemplo con tijeras de disección o un bisturí.

- 5 Antes de separar las células del tejido digerido, cualquier fragmento restante del tejido sin digerir se descarta opcionalmente para facilitar la posterior purificación de las células. Dependiendo del tamaño, el tejido sin digerir se puede por ejemplo eliminar mediante extracción física (p. ej. con fórceps), decantar, aspirar, sedimentar (opcionalmente acelerado por centrifugación), o filtrar.
- 10 La separación de las células a partir del tejido digerido se logra mediante la sedimentación de las células a partir de una mezcla homogénea que contiene el tejido digerido. Aunque se puede usar sedimentación por gravedad, el proceso de sedimentación se puede acelerar mediante, por ejemplo, una centrifuga para mejorar el movimiento descendente de las células a través de (y, en cierto sentido fuera de) la mezcla. Uno de estos procesos se describe en el ejemplo 1. Después de la separación, las células madre de la gelatina de Wharton carecen sustancialmente de la gelatina de Wharton. Dado que el tejido digerido es generalmente viscoso, el tejido se puede lavar o diluir con una solución estéril apropiada (como por ejemplo una solución salina tamponada) en cualquier etapa del proceso. De hecho, después de que las células se hayan separado de la mezcla, se pueden realizar más lavados para limpiar tanto como se desee las células.

20 Células madre nativas de gelatina de Wharton

- Las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar purificadas se pueden usar inmediatamente en un paciente, si hay una necesidad inmediata. Típicamente, sin embargo, las células se criopreservan en nitrógeno líquido hasta que sean necesarias, típicamente con un crioprotector como por ejemplo DMSO o dextrano, y a menudo en una solución como por ejemplo un plasma autólogo o albúmina sérica humana al 5 %. Como células madre multipotentes, las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar se pueden usar para el tratamiento de o para regenerar cualquiera de las variedades de tejidos como por ejemplo un hueso, cartílago, grasa o músculo. Estas células pueden facilitar injerto hematopoyético y tienen el potencial de regular y suprimir las respuestas inmunitarias en el huésped.
- 30 Como se describe en el ejemplo 4, una población de células sin cultivar a partir de la gelatina de Wharton es demostrablemente diferente, a nivel molecular, de una población de células a partir de la gelatina de Wharton que se han ampliado en un cultivo *ex vivo*. Por ejemplo, aunque ambas poblaciones incluyen células que expresan CD49B, CD105, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29, y CD90, las poblaciones difieren en sus perfiles de expresión para la mayoría si no todos estos marcadores. Por lo tanto, se pueden usar estos u otros marcadores individualmente o en combinación (como por ejemplo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de estos marcadores), para identificar y caracterizar una población de células madre, como por ejemplo aquellas derivadas del tejido del cordón umbilical, y/o para caracterizar la potencia biológica de las células.

40 Productos adicionales

- Además el proceso de purificación produce productos útiles adicionales. Por ejemplo, cuando se separan las células del tejido digerido, el tejido digerido con una reducción del número de células es una solución rica, estéril que se puede usar para el mantenimiento de las células (en cultivos, por ejemplo). Se aprecia que algunas células pueden estar presentes aunque en número sustancialmente reducido, dentro de esta solución rica estéril con una reducción del número de células derivada a partir del tejido digerido. Alternativamente, la solución puede estar totalmente desprovista de células. Esta solución homogénea se puede congelar (por ejemplo, a -20 °C o menos) para un uso posterior.
- 50 Cualquier fragmento de tejido sin digerir después del proceso de digestión es además particularmente útil, ya que se puede usar como una fuente de células madre mesenquimales cultivadas usando procedimiento estándar para ampliar las células madre mesenquimales en el cultivo a partir de la gelatina de Wharton. De hecho, la solución homogénea de la gelatina de Wharton que es, en cierto sentido, un subproducto del proceso de purificación se puede usar en el cultivo de células madre mesenquimales a partir de los fragmentos del tejido sin digerir. De esta forma, el proceso de purificación cuyo primer propósito es la preparación de células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar puede proporcionar además, como un beneficio añadido, células madre mesenquimales que se amplían en el cultivo a partir de los fragmentos del tejido sin digerir con la ayuda de la solución de la gelatina de Wharton con una reducción del número de células.

- 60 En consecuencia, la presente invención proporciona dos fuentes para la siembra y derivación de la gelatina de

Wharton expandida en cultivo derivada de células madre mesenquimales La primera fuente es el tejido del cordón umbilical sin digerir. Porque la digestión enzimática raramente digiere completamente el tejido, el tejido sin digerir restante se puede utilizar como una fuente de siembra para la expansión de células madre mesenquimales. Una segunda fuente para la derivación de las células madre mesenquimales son las células madre de la gelatina de Wharton derivada a partir del tejido digerido. La digestión enzimática escinde los enlaces cruzados del colágeno dentro de la gelatina de Wharton y libera las células incrustadas. Como se describe previamente, se pueden procesar y crío conservar las células liberadas en la forma de suspensiones celulares únicas para un uso terapéutico posterior. Alternativamente, estas células se pueden usar como una fuente de siembra para la expansión de las células madre mesenquimales. Además, la gelatina de Wharton con una reducción del número de células después de la digestión se puede usar como un suplemento para la derivación de las células madre mesenquimales a partir de los tejidos digeridos y sin digerir. Este uso como suplemento no es necesario para la derivación del cultivo pero puede reducir el tiempo necesario para la derivación y ampliación.

Además del cultivo de adherencia bidimensional usado rutinariamente para la expansión de las células madre mesenquimales, se pueden utilizar biorreactores para ampliar las células madre mesenquimales en cultivos de suspensión tridimensionales. Los biorreactores permiten la producción escalada e imitan estrechamente las características de perfusión *in vivo* del cordón umbilical. Las células madre mesenquimales pueden derivar inicialmente de los cultivos bidimensionales o tridimensionales y por consiguiente propagarse en cultivos tridimensionales para la producción escalada. Los biorreactores pueden suplementarse con microesferas portadoras para permitir la adherencia y la propagación de las células madre mesenquimales dentro de los biorreactores.

EJEMPLOS

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos, que se proporcionan solo para propósitos ilustrativos, y de ninguna forma deben interpretarse como una limitación del alcance o el contenido de la invención.

Ejemplo 1. Purificación de células madre nativas de la gelatina de Wharton y solución homogénea de gelatina de Wharton.

Los cordones umbilicales se recogieron en recipientes para muestras estériles dentro de las 48 horas siguientes al momento de la entrega. En un armario de seguridad biológica, se añadieron 10 ml de tampón B (50 µg/ml de gentamicina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en la solución salina tamponada con fosfato Dulbecco) al cordón umbilical en una cámara de recogida de cordones umbilicales. También se pueden añadir otros antibióticos, como por ejemplo 0,25 µg/ml de anfotericina B, 100 µg/ml de estreptomina y/o 10 µg/ml de ciprofloxacina, al tampón B o sustituirlos por cualquiera de los antibióticos en el tampón B. Después se mezcla el contenido de la cámara de recogida mediante agitación por rotación suave y se mantiene a temperatura ambiente menos de 72 horas. El contenido se mezcló de nuevo por agitación por rotación suave durante aproximadamente 10-15 segundos para limpiar el tejido del cordón umbilical. Si se detectó sangre coagulada en la superficie del cordón umbilical, se eliminó cuidadosamente usando herramientas de disección.

El cordón umbilical se transfirió a una placa Petri usando pinzas estériles y cortando segmentos de 3-5 cm usando unas tijeras o pinzas para el cordón umbilical. Cada segmento se diseccionó individualmente como sigue. Brevemente, un segmento a diseccionar se colocó en una placa Petri de 150 mm. Las dos arterias y una vena del cordón umbilical se colocaron visualizando la sección transversal del segmento del tejido. Usando tijeras de disección, se hizo una incisión entre las dos arterias. Con dos tejidos o fórceps Dumont, se sacó el cordón a lo largo de la longitud del tejido, arrancando cuidadosamente el tejido de las arterias y venas. Una vez que el tejido estuvo abierto, se localizó y extirpó la vena usando un fórceps de punta fina estéril en cada mano. Las dos arterias se localizaron y extirparon posteriormente, y el tejido diseccionado se colocó en la tapa interior, estéril de la placa de disección de 150 mm.

Después con las tijeras de disección se trituró el tejido en pequeñas hebras/cadenas durante al menos 5 minutos o hasta que se obtuvo un tejido triturado homogéneo. La disección y el triturado se realizaron en diferentes partes de la placa de disección para minimizar la contaminación con excesiva sangre y/o vasos diseccionados. El tejido triturado final parecía tejido triturado y tenía pocos o ningún fragmento de tejido obvio. Generalmente, las piezas de tejido triturado tenían una sección transversal de aproximadamente 1 mm². El tejido triturado estaba situado en un tubo cónico estéril, etiquetado.

Además una vez que todos los segmentos del tejido del cordón umbilical fueron diseccionados, triturados y añadidos al tubo cónico, se añadieron 10 ml de solución CB (2,5 mg/ml de colagenasa NB6 (Serva) y 2 mm de cloruro cálcico en la solución salina tamponada con fosfato Dulbecco). Se mezcló el contenido del tubo invirtiéndolo/agitándolo

varias veces hasta que se obtuvo una mezcla uniforme. Se colocó parafina alrededor de la tapa del tubo para evitar fugas y contaminación cruzada. Se pulverizó la parte exterior del tubo con etanol al 70 % y se colocó en un agitador orbital/mezclador a aproximadamente 175 RPM en el interior de una incubadora a 37 °C durante dos horas aproximadamente. Cada hora se agitó enérgicamente el tubo para ayudar a disociar el tejido. Después de 5 aproximadamente dos horas, se pulverizó de nuevo el tubo con etanol al 70 % y se devolvió al armario de seguridad biológica.

Después el tejido digerido se filtró usando una unidad de filtrado Steriflip® (Millipore) para eliminar cualquier tejido sin digerir del tejido digerido. Dado que la gelatina de Wharton digerida tiene una consistencia viscosa similar a la miel, 10 se actuó con cuidado para evitar la contaminación al abrir las tapas y manipular la gelatina. El tubo se colocó en posición vertical, y se quitó la tapa cuidadosamente. Para eliminar la gelatina que conecta el tubo y la tapa de la forma más completa y estéril posible, se separaron el tubo y la tapa hasta que les siguieron pequeñas hebras de gelatina. Los movimientos circulares eliminaron las hebras finales de gelatina de la tapa. Se actuó con cuidado para no contaminar el cuello del tubo con la gelatina. Una vez quitada la tapa, se añadieron 20 ml de solución salina 15 tamponada con fosfato Dulbecco para diluir la gelatina. La tapa se reemplazó y ajustó, y el tubo se invirtió o agitó varias veces para mezclar. Se quitó de nuevo la tapa cuidadosamente y la unidad de filtrado Steriflip® se enroscó en la parte superior del tubo y se cerró herméticamente. Después el montaje se volcó para que el tubo cónico de 50 ml quedara boca abajo.

20 Se conectó una fuente de vacío regulada al puerto de vacío en el lateral de la unidad de filtrado. Mientras se realizaba el filtrado, se mantuvo la unidad de filtrado en una posición vertical. Si fue necesario, el montaje de tubo/filtro se agitó verticalmente para desprender el tejido retenido en el filtro. Una vez que se filtró todo el líquido, se apagó la fuente de vacío y se sacó el tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato Dulbecco al tubo cónico de 50 ml para lavar cualquier célula restante que pudiera haberse adherido a los 25 laterales o al fondo del tubo. La tapa del tubo se reemplazó y ajustó y el tubo se invirtió o agitó varias veces para lavar el fondo y los laterales del tubo. Se volvió a quitar la tapa y se volvió a conectar el tubo a la unidad de filtrado. Se volvió a aplicar vacío hasta que todo el líquido atravesó el filtro, en cuyo momento se desconectó el montaje de la fuente de vacío.

30 El volumen total del filtrado era de aproximadamente 50 ml. Si fue necesario, se añadió al filtrado solución salina tamponada con fosfato Dulbecco para llegar al volumen final de 50 ml. Se colocó la tapa en el tubo de filtrado y se cerró herméticamente. Se pulverizó la parte exterior del tubo con alcohol al 70 % y se selló con película para evitar las fugas y la contaminación cruzada. El tubo se invirtió/agitó varias veces hasta que la gelatina y la solución salina tamponada con fosfato Dulbecco se homogeneizaron. Después el tubo se colocó en un agitador (a 175 RPM) en una 35 incubadora a 37 °C durante cinco minutos para homogeneizar más la gelatina, con inversiones/agitaciones adicionales cuando se necesitaron hasta que se obtuvo una mezcla uniforme. Se pulverizó de nuevo el tubo con etanol al 70 % y se devolvió al armario de seguridad biológica.

La gelatina de Wharton homogeneizada, digerida se dividió en varios tubos cónicos de 50 ml dependiendo del peso inicial del cordón umbilical. Si el peso inicial no fue superior a 15 gramos, se usó un único tubo cónico. Si el peso inicial no fue superior a 30 gramos, se usaron dos tubos cónicos. El número de tubos usados fue igual al peso inicial del cordón umbilical en gramos, dividido por 15, redondeado hacia arriba. Cada tubo recibió un volumen aproximadamente igual de gelatina, se actuó con cuidado de no contaminar los cuellos de los tubos.

45 Después el volumen de cada tubo se llevó hasta 50 ml con solución salina tamponada con fosfato Dulbecco, y el contenido de cada tubo se homogeneizó de nuevo. Posteriormente, cada tubo se cerró herméticamente, se pulverizó con etanol al 70 %, se selló con película, se invirtió/agitó varias veces, y se colocó en un agitador (a 175 RPM) en una incubadora a 37 °C durante cinco minutos para homogeneizar más la gelatina, con inversiones/agitaciones adicionales cuando se necesitaron hasta que se obtuvo una mezcla uniforme.

50 Una vez homogeneizados, se hicieron girar a los tubos durante 20 minutos a 750 x g a 37 °C. Después de girar normalmente quedó sedimento celular en el fondo de cada tubo de 50 ml. En la ausencia de un sedimento, se volvió a hacer girar a los tubos a 1000 x g durante 15 minutos a 37 °C. Se pulverizó a los tubos con etanol al 70 % y se les devolvió al armario de seguridad biológica. El sobrenadante se decantó lentamente, a un ritmo constante, sin agitar o 55 balancear el tubo para evitar que se desprendiera el sedimento. El sobrenadante decantado, una solución homogénea de gelatina de Wharton con una reducción del número de células, se almacenó a o por debajo de - 20 °C como un reactivo separado para el cultivo de células madre.

Para cada sedimento celular, se añadieron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato Dulbecco. Los tubos se 60 cerraron firmemente y se mezclaron con agitador vórtex, invirtieron, y/o se transfirieron con pipeta varias veces para

que se mezclaran correctamente hasta que las células quedaran completamente en suspensión. Después los contenidos de todos los tubos de muestra se combinaron usando una pipeta en un tubo. Los tubos de muestra se volvieron a lavar con solución salina tamponada con fosfato Dulbecco para desprender cualquier célula restante, que se añadió además al tubo combinado, y el volumen se llevó a 50 ml usando solución salina tamponada con fosfato

- 5 Dulbecco. Se cerró el tubo y se mezcló con agitador vórtex/invertió varias veces para mezclar. Se hizo girar al tubo durante 15 minutos a 500 x g a 37 °C. Normalmente quedó sedimento celular en el fondo de cada tubo. En la ausencia de un sedimento, se volvió a hacer girar al tubo a 750 x g durante 10 minutos a 37 °C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante en una matraz de residuos para no alterar el sedimento celular.
- 10 Posteriormente, se añadieron 25 ml de solución salina tamponada con fosfato Dulbecco al sedimento celular y, después de cerrar y mezclar con agitador vórtex/invertir varias veces el tubo para volver a suspender las células, las células pasaron a través de un filtro Tube-top de 70 micrómetros. El filtro se colocó en la parte superior de un tubo cónico de 50 ml estéril. Las células resuspendidas se liberaron gota a gota de la pipeta de 25 ml estéril, directamente por encima del centro del filtro pero sin tocar el filtro. La suspensión celular filtrada se recogió en el tubo cónico de 50
- 15 ml. Se usó una solución salina adicional 20 ml tamponada con fosfato Dulbecco adicional para lavar el tubo anterior para maximizar la recuperación de las células, después de lavar el tubo, estos 20 ml pasaron también gota a gota a través del filtro. La solución salina tamponada con fosfato Dulbecco adicional pasó gota a gota a través del filtro para llegar al volumen final de 50 ml.
- 20 Se hizo girar el filtrado durante 10 minutos a 500 x g a 37 °C. Normalmente quedó sedimento celular en el fondo de cada tubo después de girar. En la ausencia de un sedimento, se volvió a hacer girar al tubo a 750 x g durante 10 minutos a 37 °C. Se pulverizó la parte exterior del tubo con alcohol al 70 % antes de devolverlo al armario de seguridad biológica, donde el sobrenadante se decantó cuidadosamente en una matraz de residuos, para no alterar el sedimento celular. Se llevó el volumen del tubo hasta 4,3 ml usando una solución salina tamponada con fosfato
- 25 Dulbecco y se mezcló el contenido del tubo mediante pipeteo, agitación, y/o mezcla con agitador vórtex. Con una pipeta de 1000 µL, la suspensión celular se mezcló y se extrajo una alícuota de 0,3 ml para análisis de control de calidad, dejando 4,0 ml de una suspensión celular purificada de células madre de gelatina de Wharton sin cultivar.

Ejemplo 2. Almacenamiento de las células madre de gelatina de Wharton sin cultivar.

- 30 La suspensión celular purificada del Ejemplo 1 se crioconservó en una bolsa de congelación de 25 ml. Usando una jeringa de 60 ml con una aguja de 18 G, se añadieron 16 ml de plasma autólogo, el 5 % de albúmina sérica humana, o una combinación de los mismos a los 4 ml de suspensión de células madre de gelatina de Wharton purificada. Se usó una almohadilla con alcohol para limpiar la parte superior de un vial con DMSO 55 %/ dextrano 5 %. Después,
- 35 se extrajeron 5 ml de mezcla de DMSO/Dextrano usando una jeringa de 60 ml con una aguja de 18 G y se añadieron lentamente a la suspensión celular. El tubo de suspensión celular se cerró herméticamente y se invirtió suavemente para mezclar, teniendo cuidado de no hacer espuma o burbujas. Usando la misma jeringa de 60 ml, se transfirieron 25 ml de suspensión celular a la bolsa de congelación. La bolsa de congelación se almacenó en un recipiente metálico en un soporte de poliestireno extruido a -80°C de 16 a 24 horas, opcionalmente seguido por un periodo
- 40 intermedio en un congelador de nitrógeno líquido en el que las células fueron expuestas solo a la fase de vapor del nitrógeno líquido y, finalmente, la fase líquida del nitrógeno líquido para un almacenamiento permanente. Alternativamente, la bolsa de congelación con células se puede almacenar permanentemente en la fase vapor del nitrógeno líquido.

Ejemplo 3. Eficacia *in vivo*

La eficacia terapéutica de las células madre de la gelatina de Wharton se demostró en un ensayo de cotrasplante con células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical para renovar un sistema hematopoyético de mamíferos.

- 50 Las células madre hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical se pueden administrar a mamíferos para reconstituir un sistema hematopoyético dañado, por ejemplo, por radiación. El cotrasplante de las células madre de la gelatina de Wharton mejora el proceso de reconstitución, mejorando el injerto de las células madre hematopoyéticas administradas y, por lo tanto, la capacidad de proliferar y reproducir un sistema hematopoyético en
- 55 el nuevo huésped.

- Para probar la eficacia de las células madre de la gelatina de Wharton, se coadministraron con células madre hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical (deficientes en NOD/SCID IL2Ry) a ratones que habían sido irradiados subletalmente el día anterior con 300 cGy de radiación gamma que extirpaba la médula ósea. Se
- 60 administraron 1.000.000 de células sanguíneas del cordón umbilical mononucleares a los ratones a través de la vena

de la cola, ya fueran solas o con 10.000, 50.000 o 100.000 células madre de la gelatina de Wharton, o con 1.000.000 de células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton. Sesenta días después, se obtuvo la médula ósea de los ratones para medir el número de células que expresan CD45 humano, un marcador de superficie celular de las células hematopoyéticas humanas y un marcador surrogado de los injertos de células madre
5 hematopoyéticas humanas.

Como se indica en la FIG. 1, los ratones irradiados que no recibieron ninguna célula carecían de las células que expresan el CD45 humano en su médula ósea el día 60. Aunque los ratones recibieron solo células sanguíneas del cordón umbilical mostraron un número sustancial de células de la médula ósea que expresan el CD45 humano, este
10 número se triplicó en ratones que recibieron células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton o células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar. Sorprendentemente, 100.000 células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar proporcionan un beneficio igual o mayor que el beneficio de 1.000.000 de células madre mesenquimales expandidas en cultivo a partir de la gelatina de Wharton, lo que sugiere que las células madre
15 de la gelatina de Wharton sin cultivar pueden ser más de diez veces más potentes *in vivo* que las células madre mesenquimales cultivadas. De hecho, tan solo 10.000 células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar fueron casi tan eficaces como 1.000.000 células madre mesenquimales cultivadas. Mientras que el mecanismo preciso para la eficacia reducida de las células madre mesenquimales cultivadas no está claro, las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar, mínimamente manipuladas parecen tener ventajas terapéuticas importantes *in vivo*.

20 Ejemplo 4. Diferencias en los perfiles de los marcadores de superficie celular

Además las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar difieren notablemente a nivel molecular de las células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton.

25 Se analizaron los niveles de trece marcadores de superficie celular en una población de células madre de la gelatina de Wharton no cultivadas utilizando ensayos estándar de anticuerpos y citometría de flujo, los resultados se describen en la FIG. 2. La FIG. 2 proporciona, para cada marcador analizado, un estándar de representación bidimensional que muestra el porcentaje de células demostrando un nivel de expresión particular del marcador, detectado por el ensayo de anticuerpos. Los resultados de las células madre de la gelatina de Wharton se
30 representan con una línea oscura, y los resultados a partir de un control se representan con una línea clara. Como se indica, las células madre de la gelatina de Wharton mostraron altos niveles de CD49B, CD105, HLA-ABC, CD73, CD44, SSEA-4, CD29, y CD90 en comparación con el control de antígenos. Las células madre de la gelatina de Wharton no demuestran expresión sustancial de los marcadores CD34 y CD45 que sería típico de las células hematopoyéticas, o de CD14, HLA-DR o CD133.

35 La expresión de los mismos marcadores se analizó en células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton; los resultados se muestran en la FIG. 3. Como se indica, en comparación con el antígeno de control, las células madre mesenquimales cultivadas demostraron altos niveles de CD49B, CD105, HLA-ABC, CD44, CD29, CD73 y CD90; un intervalo más amplio de niveles de expresión de SSEA-4; y una falta de CD14, CD34,
40 CD45 y HLA-DR. Comparando la FIG. 2 y la FIG. 3, incluso para los marcadores como por ejemplo CD105 que son elevados tanto en células madre mesenquimales cultivadas como en células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar, los patrones de expresión pueden ser muy diferentes, como los niveles observados de expresión en células madre de la gelatina de Wharton sustancialmente solapadas con el control de antígenos, mientras que las células madre mesenquimales cultivadas *ex vivo* muestran niveles más altos de expresión con poco solapamiento con el
45 control de antígenos. Por lo tanto, las células que han sido purificadas a partir de la gelatina de Wharton sin cultivar no son especialmente potentes *in vivo*, también son marcadamente diferentes de las células madre mesenquimales cultivadas y expandidas a partir de la gelatina de Wharton como queda evidenciado por los patrones de sus marcadores de superficie celular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar células madre de gelatina de Wharton sin cultivar, consistiendo el procedimiento en:
- 5 eliminar las arterias y las venas de un cordón umbilical que comprende la gelatina de Wharton; digerir el cordón umbilical triturando mecánicamente el cordón umbilical; lavar o diluir el cordón umbilical digerido antes de separarlo del cordón umbilical sin digerir; separar el cordón umbilical digerido y sin digerir;
- 10 sedimentar el cordón umbilical digerido por centrifugación; filtrar el cordón umbilical digerido; separar las células madre de la gelatina de Wharton del filtrado; y congelar las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar.
- 15 2. Un procedimiento para purificar células madre de la gelatina de Wharton cultivadas y sin cultivar, comprendiendo el procedimiento:
- la purificación de las células madre de la gelatina de Wharton de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1; y
- 20 el cultivo de las células madre mesenquimales a partir del cordón umbilical sin digerir.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde las células madre mesenquimales se cultivan en el cordón umbilical digerido.
- 25 4. Células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar, purificadas que carecen sustancialmente de gelatina de Wharton semisólida para su uso en terapia donde las células tienen los niveles del CD73 reducido, y del CD105 reducidos en comparación con las células madre mesenquimales cultivadas a partir de la gelatina de Wharton.
- 30 5. Las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar para uso de acuerdo con la reivindicación 4 donde las células madre de la gelatina de Wharton se mantienen en una solución estéril.
6. Las células madre de la gelatina de Wharton sin cultivar, purificadas para uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 donde las células madre de gelatina de Wharton son autólogas o alogénicas al sujeto.
- 35

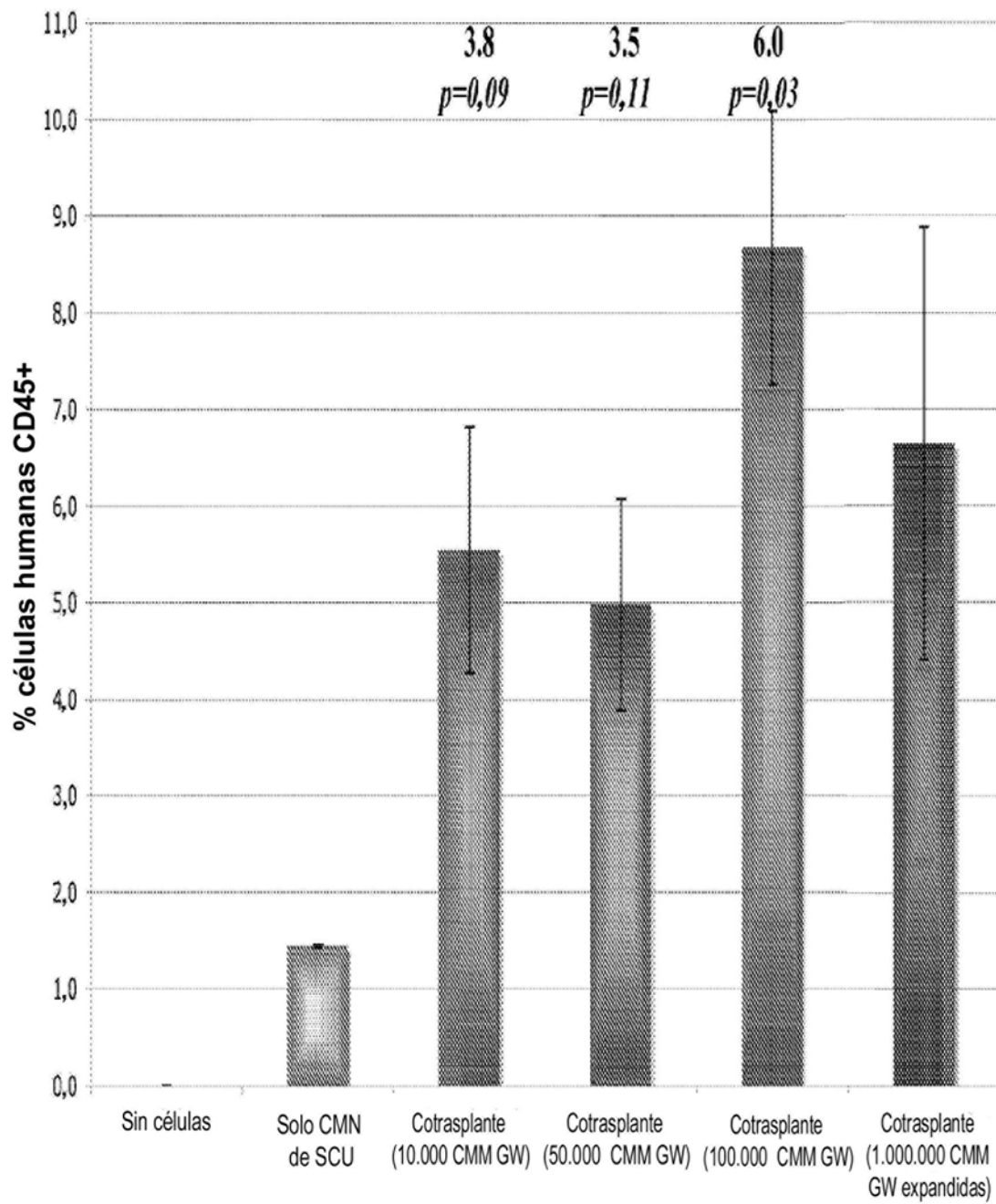


Fig. 1

Perfil de proteínas/marcadores de superficie celular de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical mínimamente manipuladas

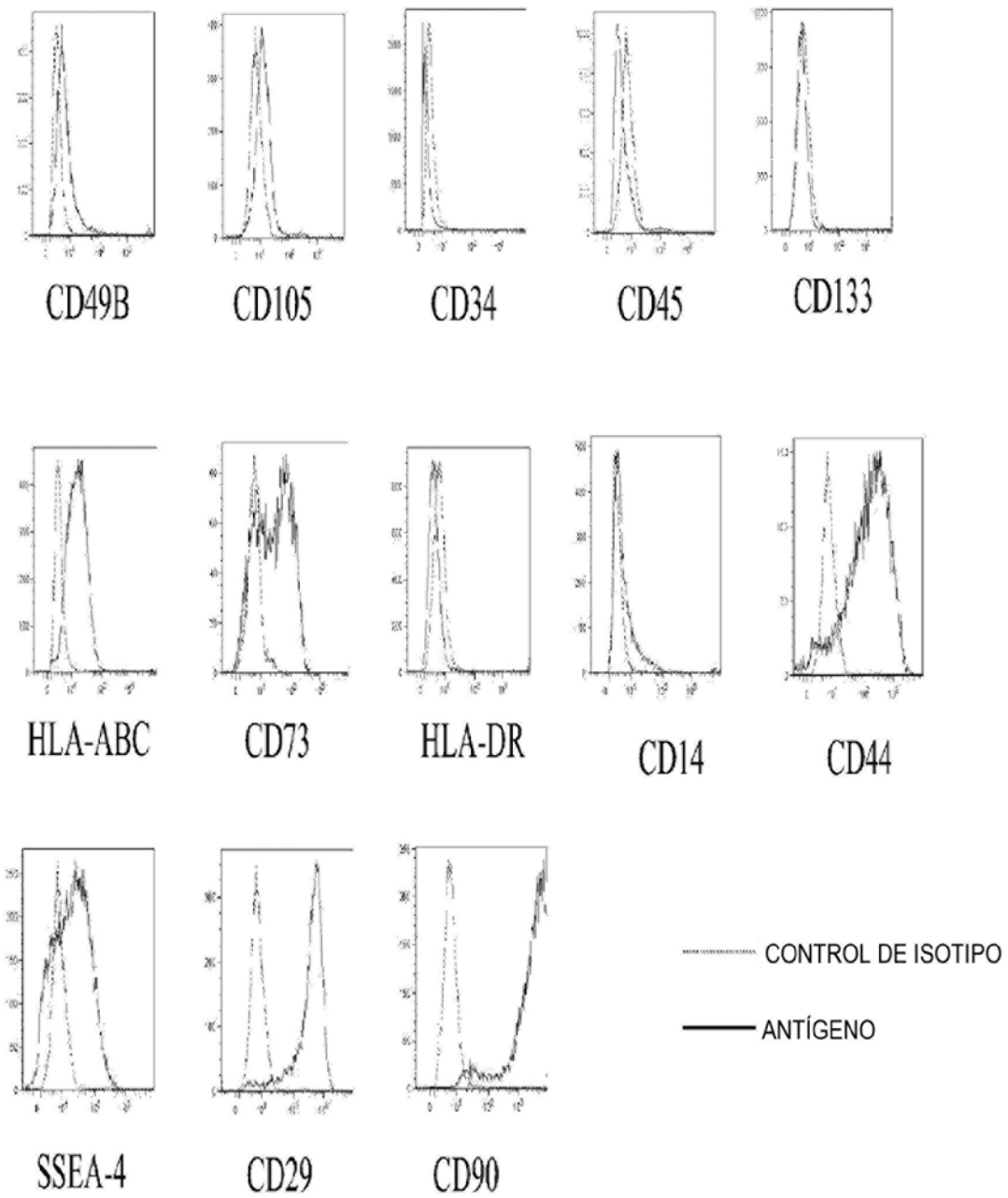


Fig. 2

Perfil de proteínas/marcadores de superficie celular de células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical *ex vivo*

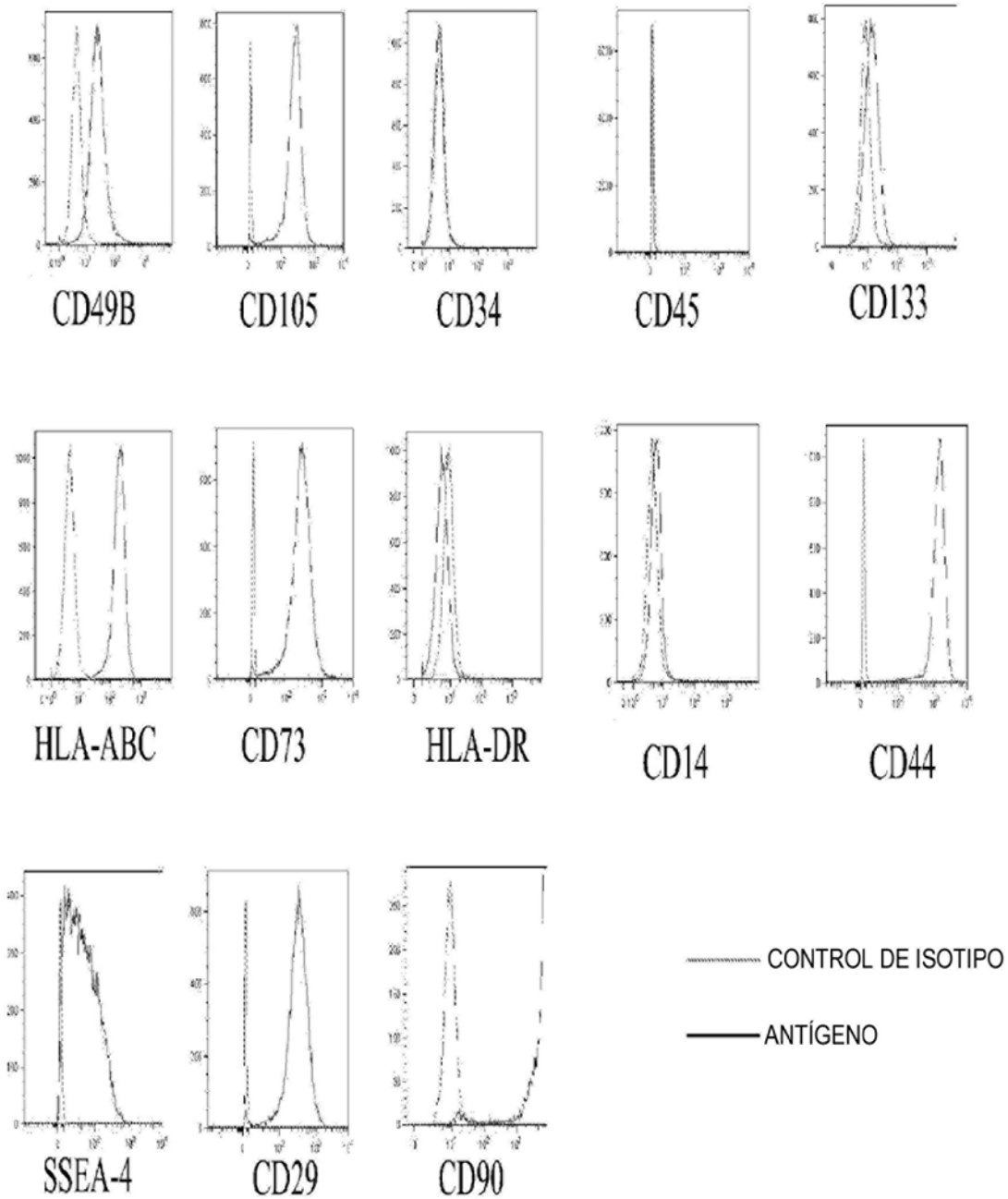


Fig. 3