

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 573**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/US2013/074615**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093598**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13812432 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2931875**

54 Título: **Medio enriquecido en nutrientes para el crecimiento de HUTC**

30 Prioridad:

14.12.2012 US 201213715532

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

11.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BHATIA, RAVINDER;
HONG, L.S. KLAUDYNE;
OZTURK, SADETTIN S. y
KAMARAJU, VENKAT H.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 667 573 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).

Medio enriquecido en nutrientes para el crecimiento de HUTC**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a medios de cultivo enriquecidos en nutrientes para el crecimiento de células dependientes de anclaje, tales como, por ejemplo, células derivadas de tejido de cordón umbilical.

10 Antecedentes de la invención

Para un producto de terapia celular alogénica, las células o tejidos se obtienen de un donante, que se manipula adicionalmente antes de administrarlo a los pacientes. Generalmente, un procedimiento de fabricación para un producto de terapia celular no homólogo incluye las etapas siguientes: descongelar un vial del banco celular y expandir las células para inocular un vaso de producción; producir células en un vaso de producción; eliminar las impurezas indeseables usadas durante la producción de células, tales como suero y tripsina; concentrar las células; formular las células en el tampón de formulación final; y congelar las células. Dichos procedimientos de fabricación pueden ser bastante complejos y costosos. Por ejemplo, las células para aplicaciones de terapia celular generalmente se cultivan y se expanden en medio de crecimiento suplementado con suero. El costo de producción de la terapia celular puede ser muy alto debido al alto coste del suero, el medio y col., consumibles utilizados en el procedimiento. Múltiples factores pueden limitar el crecimiento de las células a alta densidad celular, incluyendo la limitación de los nutrientes, la acumulación de subproductos celulares en cultivo, el entorno físico, etc. Por consiguiente, es deseable aumentar las células volumétricas producidas desde un vaso de producción cultivando las células a una densidad celular alta.

Anteriormente, se ha demostrado que las células dependientes de anclaje, tales como, por ejemplo, las células derivadas de tejido del cordón umbilical humano (hUTC), pueden crecer hasta una alta densidad celular mediante el intercambio de un medio de crecimiento celular que contiene un 15 % de suero bovino fetal (FBS) al tercer día del ciclo. Sin embargo, dicho intercambio de medio es menos deseable debido al alto coste del suero, el alto uso de suero para la producción y a las manipulaciones operacionales adicionales. Por lo tanto, un procedimiento con intercambio de medio no es comercialmente factible.

Lo que se necesita es un nuevo procedimiento para cultivar células sin la necesidad de intercambiar un medio de crecimiento celular que sea comercialmente factible.

Alfa MEM con nucleósidos es un medio esencial mínimo que contiene los nucleósidos adenosina, timidina, citidina, uridina y guanosina. En el documento US2004/0151709 se desvela una composición para establecer, mantener y extender la proliferación de líneas celulares. El documento WO91/10726 se refiere a un medio de crecimiento celular que permite el mantenimiento y la propagación de las células leucémicas dependientes del anclaje en el CO₂ atmosférico normal.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es un procedimiento de cultivo de células derivadas de tejido de cordón umbilical que comprende:

cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical sembradas en microvehículos en un medio de cultivo que comprende aminoácidos, vitaminas, sales, nucleósidos, ácido lipoico / tióctico, etanolamina, insulina, transferrina, selenio sódico, que se suplementa con suero, durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población inicial deseada;

añadir una solución nutritiva sin suero, que comprende aminoácidos, vitaminas, sales, insulina, transferrina, etanolamina, ácido lipoico / ácido tióctico, selenio sódico, después de que las células hayan alcanzado la densidad de población inicial deseada; y

cultivar las células durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población final deseada

en la que las células derivadas de tejido de cordón umbilical se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresar CD13, CD90, HLA-ABC, y no expresan CD34, CD117 y HLA-DR,

y en el que los nucleósidos son al menos 0,0001 g / l de timidina, y al menos 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina.

El procedimiento puede además comprender etapas adicionales. En una realización, el procedimiento comprende

además sembrar las células en los microvehículos. En otra realización, el procedimiento comprende además aislar las células después del cultivo. En una realización, la densidad de población inicial deseada se logra después de 3 a 4 días. El procedimiento no requiere intercambio de medios. El procedimiento puede llevarse a cabo en un sistema de cultivo en botella de cultivo rotatoria y los microvehículos pueden tener una superficie tratada con amina.

5 Las células derivadas de tejido de cordón umbilical utilizadas en el procedimiento se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresar CD13, CD90, HLA-ABC, y no expresan CD34, CD117 y HLA-DR. En una
10 realización, las células no expresan hTERT ni telomerasa. Las características de las células antes y después del cultivo son sustancialmente las mismas. En una realización, las características de las células antes y después del cultivo son las mismas.

En una realización, el medio de cultivo utilizado en el procedimiento comprende:

15 los aminoácidos L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; L-alanina; L-aspargina; ácido L-aspártico; ácido L-glutámico; L-prolina; y L-aurina;

20 las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina);

las sales cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio;

25 los nucleósidos timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina;

insulina; transferrina; ácido lipoico / ácido tióctico; etanolamina; selenito de sodio; y una o más fuentes de energía (tales como, por ejemplo, D-glucosa y piruvato sódico).

30 En otra realización, el medio de cultivo utilizado en el procedimiento comprende:

35 al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-arginina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,2 g/l de L-glutamina; al menos aproximadamente 0,01 g/l glicina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-isoleucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-lisina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-metionina; al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-fenilalanina; al menos aproximadamente 0,03 g/l de L-serina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-treonina; al menos aproximadamente 0,009 g/l de L-triptofan; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-tirosina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-valina; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-cisteína; al menos aproximadamente 0,0004 g/l de L-alanina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-aspargina; al menos aproximadamente 0,006 g/l de L-ácido aspártico; al menos 0,03 g/l de L-ácido glutámico; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-prolina; y al menos aproximadamente 0,0003 g/l de L-aurina;

45 de aproximadamente 5×10^{-6} g/l a aproximadamente 0,015 g/l de cada una de las vitaminas;

al menos aproximadamente 0,05 g / l de cloruro de calcio anhidro, al menos aproximadamente 0,1 g / l de cloruro de potasio; al menos aproximadamente 0,2 g / l de sulfato de magnesio, al menos aproximadamente 0,08 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H₂O y al menos aproximadamente 0,0005 g / l de fosfato de sodio, heptahidrato dibásico(Na₂HPO₄·7H₂O);

50 al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina; y

55 al menos 0,003 g / l de insulina, al menos 0,05 g / l de transferrina, al menos aproximadamente 5×10^6 g / l de ácido lipoico / ácido tióctico, al menos 0,05 g / l de etanolamina y al menos aproximadamente 0,00004 g / l de selenito de sodio.

60 El medio de cultivo utilizado en el procedimiento se suplementa con de 2 a 20 % de FBS. En una realización, el medio de cultivo se suplementa con aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 % o aproximadamente 15 % de FBS.

En una realización, la solución de nutrientes sin suero usada en el procedimiento comprende:

65 los aminoácidos L-arginina, L-cistina, L-cisteína, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, l -triptofano, L-tirosina, L-valina, L-alanina, L-aspargina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-aurina;

las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina);

5 las sales fosfato sódico monobásico y fosfato sódico heptahidrato dibásico;

los oligoelementos sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), sulfato de cinc, heptahidratado, (ZnSO₄·7H₂O);

10 los nucleósidos adenosina, citidina, uridina y guanosina;

insulina; transferrina; etanolamina; ácido lipoico / ácido tióctico; y selenito de sodio.

15 El medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero también pueden contener otros componentes. Por ejemplo, el medio de cultivo y / o la solución de nutrientes sin suero pueden comprender además putrescina, un estabilizante y / o un agente espumante.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

20 Descripción detallada

25 En la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma. Estas realizaciones se describen con suficiente detalle para permitir a los expertos en la materia poner en práctica la invención y se entiende que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios lógicos estructurales, mecánicos, eléctricos y químicos. Para evitar detalles que no sean necesarios para permitir a los expertos en la materia poner en práctica las realizaciones descritas en el presente documento, la descripción puede omitir cierta información conocida por los expertos en la materia. La siguiente descripción detallada, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitante.

30 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical humano ("hUTC"), unidas a microvehículos en un medio que contiene suero a una alta densidad celular sin intercambio de medio mediante cultivo de alimentación con solución de nutrientes sin suero en el medio del ciclo. El procedimiento permite el crecimiento de células con una alta densidad celular sin afectar a la función biológica de las células. Dado que la invención aumenta el rendimiento del biorreactor de producción, la invención proporciona 35 beneficios económicos y comerciales.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de cultivo de hUTC unidas a microvehículos hasta llegar a una alta densidad celular en cultivo en suspensión en matraces de agitación enriqueciendo el medio de cultivo que contiene suero con nutrientes y también se desvela la alimentación del cultivo con nutrientes sin suero. Este procedimiento 40 elimina el intercambio de medio para cultivar hUTC hasta una densidad alta.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan diversos términos. Dichos términos tendrán el significado habitual en la materia, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente 45 deben interpretarse de forma consistente con la definición proporcionada en el presente documento.

50 En una realización, las células de la presente invención se denominan, generalmente, células posparto o células derivadas de posparto (PPDC). Estas células son, más específicamente, "células derivadas umbilicales" o "células derivadas de cordón umbilical" (UDC), o "células derivadas de tejido de cordón umbilical" (UTC). Además, las células pueden describirse como células madre o progenitoras, utilizándose esta última expresión en el sentido amplio. El término "derivada/s" se utiliza para indicar que las células se han obtenido de su fuente biológica y se han cultivado o *manipulado* de otra manera *in vitro* (por ejemplo, se han cultivado en un medio de crecimiento para expandir la población y/o para producir una línea celular). Más adelante se describen detalladamente las manipulaciones *in vitro* de células madre de cordón umbilical y las características únicas de las células derivadas del cordón umbilical de la presente invención. 55

60 Las células madre son células indiferenciadas definidas por la capacidad de una sola célula tanto para autorrenovarse como para diferenciarse para producir células descendientes, incluidas células progenitoras autorrenovantes, progenitoras no renovantes y células terminalmente diferenciadas. Las células madre también se caracterizan por su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células funcionales de diversos linajes celulares a partir de múltiples capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), así como para dar lugar a los tejidos de múltiples capas germinales después del trasplante y para contribuir sustancialmente a la mayoría, si no todos, los tejidos después de inyectarse en blastocistos.

65 Las células madre se clasifican por su potencial de desarrollo como: (1) totipotenciales; (2) pluripotenciales; (3) multipotenciales; (4) oligopotenciales; y (5) unipotenciales. Las células totipotenciales son capaces de dar lugar a todos los tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Las células pluripotenciales son capaces de dar lugar a

5 todos los tipos de células embrionarias. Las células multipotenciales son capaces de dar lugar a un subconjunto de linajes celulares, pero todos dentro de un tejido, órgano o sistema fisiológico concreto. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC) pueden producir una descendencia que incluye HSC (autorrenovantes), progenitoras oligopotenciales limitadas a células sanguíneas, y todos los tipos de células y elementos (por ejemplo, plaquetas) que son componentes normales de la sangre. Las células que son oligopotenciales son capaces de dar lugar a un subconjunto más restringido de linajes celulares que las células madre multipotenciales; Las células que son unipotenciales son capaces de dar lugar a un único linaje celular (por ejemplo, células madre espermatogénicas).

10 Las células madre también se clasifican según la fuente de la que pueden obtenerse. Una célula madre adulta es, generalmente, una célula indiferenciada multipotencial que se encuentra en tejido que comprende múltiples tipos de células diferenciadas. La célula madre adulta puede autorrenovarse. En circunstancias normales, también puede diferenciarse para producir los tipos especializados de células del tejido del que se originaron y, posiblemente, otros tipos de tejidos. Una célula madre embrionaria es una célula pluripotencial de la masa celular interna de un embrión en fase de blastocisto. Una célula madre fetal es la que procede de tejidos o membranas fetales. Una célula madre posparto es una célula multipotencial o pluripotencial que procede sustancialmente de tejido extraembrionario disponible después del nacimiento, a saber, el cordón umbilical. Se ha descubierto que estas células poseen rasgos característicos de las células madre pluripotenciales, incluidos la rápida proliferación y el potencial de diferenciarse a muchos linajes celulares. Las células madre posparto pueden ser de origen sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical) o de origen no sanguíneo (por ejemplo, como las obtenidas a partir de tejidos no sanguíneos del cordón umbilical y la placenta).

25 Se utilizan diversos términos y expresiones para describir las células en cultivo. "Cultivo celular" se refiere, en general, a células sacadas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas ("en cultivo" o "cultivadas"). Un "cultivo de células primarias" es un cultivo de células, tejidos u órganos sacados directamente de uno o más organismos antes del primer subcultivo. Las células "se expanden" en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que da como resultado una población mayor de las células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular se mide, a veces, por la cantidad de tiempo necesario para que las células dupliquen su número. Esto se conoce como "tiempo de duplicación".

30 La expresión "línea celular" generalmente se refiere a una población de células formada mediante uno o más subcultivos de un cultivo de células primarias. Cada ronda de subcultivo se denomina pase. Cuando se subcultivan las células, se dice que "han sido sometidas a pases". Una población específica de células, o una línea celular, se denomina o caracteriza a veces por el número de veces que se ha sometido a pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que se ha sometido a pases diez veces puede denominarse cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo después del aislamiento de las células a partir del tejido, se designa P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de población durante el periodo de pases; por lo tanto, el número de duplicaciones de la población de un cultivo es superior al número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo entre pases depende de muchos factores, incluidos, pero no limitados a los mismos, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, las condiciones de crecimiento y el tiempo entre pases.

45 La "diferenciación" es el proceso mediante el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tales como, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula muscular. Una "célula diferenciada" es la que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje de una célula. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que ha avanzado en la vía de diferenciación hasta un punto en la que, en circunstancias normales, continuará diferenciándose hasta un tipo de célula o subconjunto de tipos de células específico, y no puede, en circunstancias normales, diferenciarse a un tipo de célula diferente o volver a un tipo de célula menos diferenciada. "Desdiferenciación" se refiere al proceso mediante el cual una célula vuelve a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje de una célula. Tal como se utiliza en el presente documento, el "linaje" de una célula define la herencia de la célula, es decir, de qué células procedía y a qué células puede dar lugar. El linaje de una célula coloca a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación.

60 En un sentido amplio, una "célula progenitora" es una célula que tiene la capacidad de crear una descendencia que está más diferenciada que ella misma y que, sin embargo, conserva la capacidad de reponer la reserva de progenitoras. Según esta definición, las propias células madre también son células progenitoras, ya que son las precursoras más inmediatas a las células terminalmente diferenciadas. Cuando se hace referencia a las células de la presente invención, tal como se describen con mayor detalle más adelante, puede utilizarse esta definición amplia de célula progenitora. En un sentido más estricto, una célula progenitora suele definirse como una célula que es una célula intermedia en la vía de diferenciación, es decir, que surge de una célula madre y es una célula intermedia en la producción de un tipo de célula o un subconjunto de tipos de células maduras. Este tipo de célula progenitora no es capaz, en general, de autorrenovarse. Por consiguiente, si se hace referencia a este tipo de célula en el presente

documento, se denominará "célula progenitora no renovante" o "célula progenitora intermedia o célula precursora".

En general, un "factor trófico" se define como una sustancia que estimula la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y/o la maduración de una célula, o estimula el aumento de la actividad de una célula.

El término "condiciones de cultivo estándar", como se usa en el presente documento, se refiere al cultivo de células a 37 °C, en una atmósfera estándar que comprende 5 % de CO₂ y una humedad relativa mantenida en aproximadamente el 100 %. Aunque las condiciones anteriores son útiles para el cultivo, debe entenderse que el experto en la técnica puede modificar tales condiciones, que apreciarán las opciones disponibles en la técnica para cultivar células.

El término "aislar", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una célula que se ha separado de su entorno natural. Este término incluye la separación física bruta de su entorno natural, por ejemplo, la extracción del animal donante. En realizaciones preferentes, una célula aislada no está presente en un tejido, es decir, la célula está separada o disociada de las células vecinas con las que normalmente está en contacto. Preferentemente, las células se administran como una suspensión celular. Como se usa en este documento, la frase "suspensión celular" incluye células que están en contacto con un medio y que han sido disociadas, por ejemplo, sometiendo un trozo de tejido a una trituración suave.

Una realización de la invención es un procedimiento de cultivo de células dependientes de anclaje aisladas usando el medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero de acuerdo con las reivindicaciones. El procedimiento para cultivar células aisladas dependientes de anclaje (tales como, por ejemplo, células derivadas de tejido de cordón umbilical) proporciona el cultivo de las células en al menos una partícula vehículo, por ejemplo, un microvehículo. El microvehículo puede estar compuesto por materiales naturales o derivados sintéticamente. Los ejemplos incluyen microvehículos a base de colágeno, microvehículos a base de dextrano o microvehículos a base de celulosa, así como vidrio, cerámica, polímeros (tales como poliestireno) o metales. El microvehículo puede estar libre de proteínas o recubierto por proteínas, por ejemplo, con colágeno. En un aspecto adicional, el microvehículo puede estar compuesto por, o recubierto con, compuestos que mejoran la unión de la célula al microvehículo y potencian la liberación de la célula desde el microvehículo, incluyendo, aunque sin limitaciones, hialuronato de sodio, poli(monostearoilglicérido co-ácido succínico), poli-D,L-láctido-co-glicólido, fibronectina, laminina, elastina, lisina, n-isopropilacrilamida, vitronectina y colágeno. Ejemplos adicionales incluyen microvehículos que poseen una microcorriente, tales como microvehículos con un par de partículas galvánicas de cinc y cobre que produce bajos niveles de electricidad biológicamente relevante; o microvehículos que son paramagnéticos, tales como microvehículos de alginato de calcio paramagnético. Los procedimientos se pueden llevar a cabo en un sistema de botella de cultivo rotatoria.

Debe entenderse que la presente invención no está limitada a procedimientos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. Se entenderá también que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante. Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células y similares.

"Microvehículos" se refiere a partículas, perlas o gránulos útiles para la unión y el crecimiento de células dependientes de anclaje en cultivo. Los microvehículos tienen las siguientes propiedades: (a) son lo suficientemente pequeños como para permitir su uso en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no causa daño por cizallamiento significativo a los microvehículos o a las células); (b) son sólidos, o tienen un núcleo sólido con un recubrimiento poroso en la superficie; y (c) sus superficies (superficie exterior e interior en el caso de vehículos porosos) pueden estar cargadas positiva o negativamente. En un aspecto, los microvehículos tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μm, y tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. Los ejemplos de microvehículos útiles incluyen Cytodex® 1, Cytodex® 2 o Cytodex® 3 (GE Healthcare Life Sciences).

En otro aspecto, el microvehículo es un vehículo sólido. Los vehículos sólidos son particularmente adecuados para la adhesión celular, por ejemplo, células dependientes de anclaje. La partícula vehículo también puede ser un microvehículo poroso. Ejemplos adicionales incluyen microvehículos que poseen una microcorriente, tales como microvehículos con un par de partículas galvánicas de cinc y cobre que produce bajos niveles de electricidad biológicamente relevante; o microvehículos que son paramagnéticos, tales como microvehículos de alginato de calcio paramagnético.

"Microvehículos porosos" se refiere a partículas útiles para la unión y el crecimiento de células dependientes de anclaje en cultivo. Los microvehículos porosos tienen las siguientes propiedades: (a) son lo suficientemente pequeños como para permitir su uso en cultivos en suspensión (con una velocidad de agitación que no causa daño por cizallamiento significativo a los microvehículos o a las células); (b) tienen poros y espacios interiores de tamaño suficiente para permitir que las células migren a los espacios interiores de la partícula; y (c) sus superficies (exterior

e interior) pueden estar cargadas positiva o negativamente. En una serie de realizaciones, los vehículos (a) tienen un diámetro de partícula global entre aproximadamente 150 y 350 μm ; (b) tienen poros que tienen un diámetro promedio de abertura de poro de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 μm ; y (c) tienen una densidad de carga positiva de entre aproximadamente 0,8 y 2,0 meq/g. En algunas realizaciones, los grupos DEAE (N,N,-dietilaminoetilo) proporcionan la carga positiva. Los microvehículos porosos útiles incluyen, sin limitación, Cytopore 1® y Cytopore 2® y Cytopore 2® (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway N.J.).

Las "células dependientes de anclaje" son células, incluidas células de mamífero, que necesitan unirse a una superficie, por ejemplo, una superficie de matraz de cultivo tisular o una superficie de partícula de microvehículo, para replicarse en cultivo tisular.

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

I. Medios de cultivo y solución de alimentación de nutrientes sin suero

Esta divulgación proporciona medios enriquecidos y soluciones concentradas de alimentación de nutrientes, que carecen de suero. Los medios y la solución de nutrientes sin suero se pueden usar para cultivar las células a alta densidad. En una realización preferente, los medios y la solución de nutrientes sin suero se pueden usar para cultivar células dependientes de anclaje, tales como, por ejemplo, hUTC, a alta densidad en matraces centrifugadores a menor consumo de suero.

En una realización, el medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero se usan para el crecimiento de células derivadas de tejido de cordón umbilical. En otra realización, el medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero son adecuados para el crecimiento de células progenitoras, incluyendo, aunque sin limitaciones, células madre mesenquimatosas, células madre derivadas de médula ósea, células derivadas de tejido placentario, células adherentes derivadas de tejidos no medulares, tales como, por ejemplo, tejido adiposo, tejido muscular, vaso sanguíneo, incluidas las células derivadas de la arteria mamaria interna, las células derivadas de la pulpa dental de los dientes, las células derivadas del líquido amniótico y fibroblastos, incluidos fibroblastos de prepucio neonatal.

A. Medios de cultivo

En una realización, el medio de cultivo comprende los L-aminoácidos comunes. En otra realización, el medio de cultivo comprende los siguientes aminoácidos: L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; y, opcionalmente, —cisteína, L-alanina; L-aspargina; L-ácido aspártico; L-ácido glutámico; L-prolina; y L-aurina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,0006 g/l a aproximadamente 0,1 g/l de cada uno de los aminoácidos.

En aún otra realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,1 g/l de L-arginina, al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,3 g/l de L-glutamina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de glicina; al menos aproximadamente 0,03 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-isoleucina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,1 g/l de L-lisina; al menos aproximadamente 0,1 g/l de L-metionina; al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-fenilalanina; al menos aproximadamente 0,03 g/l de L-serina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-treonina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-triptófano; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-tirosina; al menos aproximadamente 0,07 g/l de L-valina; y, opcionalmente, al menos aproximadamente 0,007 g/l de L-cisteína; al menos aproximadamente 0,0005 g/l de L-alanina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-aspargina; al menos aproximadamente 0,006 g/l de L-ácido aspártico; al menos 0,03 g/l de L-ácido glutámico; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-prolina; y al menos aproximadamente 0,0006 g/l de L-aurina;

En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,09705 g/l de L-Arginina; aproximadamente 0,06779 g/l de L-Cistina; aproximadamente 0,009224 g/l de L-cisteína; aproximadamente 0,584 g/l de L-glutamina; aproximadamente 0,031125 g/l de glicina; aproximadamente 0,048288 g/l de L-histidina; aproximadamente 0,163713 g/l de L-Isoleucina; aproximadamente 0,163713 g/l de L-Leucina; aproximadamente 0,16807 g/l de L-lisina; aproximadamente 0,036748 g/l de L-metionina; aproximadamente 0,073695 g/l de L-fenilalanina; aproximadamente 0,05145 g/l de L-serina; aproximadamente 0,108609 g/l de L-treonina; aproximadamente 0,018457 g/l de L-triptófano; aproximadamente 0,121813 g/l de L-tirosina; aproximadamente 0,111105 g/l de L-valina; aproximadamente 0,000668 g/l de L-alanina; aproximadamente 0,031978 g/l de L-aspargina; aproximadamente 0,0080 g/l de L-ácido aspártico, aproximadamente 0,054728 g/l de L-ácido glutámico; aproximadamente 0,02403 g/l de L-prolina; y aproximadamente 0,000844 g/l de L-aurina.

El medio de cultivo comprende además una o más vitaminas. En una realización, el medio de cultivo comprende al menos las siguientes vitaminas: D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; I-inositol; niacinamida; piridoxal;

5 riboflavina; tiamina; y, opcionalmente, d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina). Los medios pueden comprender además Vitamina C y Vitamina A. En otra realización, el medio de cultivo comprende de aproximadamente 5×10^{-6} g/l a aproximadamente 0,015 g/l de cada una de las vitaminas. En una realización, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,004338 g/l de pantotenato de D-calcio; aproximadamente 0,006094 g/l de cloruro de colina; aproximadamente 0,004302 g/l de ácido fólico; aproximadamente 0,009568 g/l de l-inositol; aproximadamente 0,004302 g/l de niacinamida; aproximadamente 0,004153 g/l de piridoxal; aproximadamente 0,000431 g/l de riboflavina; aproximadamente 0,004304 g/l de tiamina; aproximadamente $3,75 \times 10^{-5}$ g/l de d-biotina; aproximadamente $1,85 \times 10^{-5}$ g/l de piridoxina y aproximadamente 0,000102 g/l de vitamina B₁₂ (cianocobalamina).

10 El medio de cultivo comprende además una o más sales inorgánicas. En una realización, el medio de cultivo comprende cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio. En otra realización, el medio de cultivo comprende cloruro de calcio, cloruro de potasio anhidro, sulfato de magnesio anhidro, fosfato de sodio anhidro monobásico H₂O, y, opcionalmente, fosfato de sodio, (Na₂HPO₄·7H₂O) heptahidrato dibásico. Dependiendo de la sal utilizada, el medio de cultivo puede comprender de al menos aproximadamente 0,005 g/l a aproximadamente 7 g/l de las sales. En una realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,01 g / l de cloruro de calcio anhidro, al menos aproximadamente 0,1 g / l de cloruro de potasio; al menos aproximadamente 0,2 g / l de sulfato de magnesio, al menos aproximadamente 0,08 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H₂O y, opcionalmente, al menos aproximadamente 0,0005 g / l de fosfato de sodio, (Na₂HPO₄·7H₂O); heptahidrato dibásico. En otra realización, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,2 g / l de cloruro de calcio anhidro, aproximadamente 0,4 g / l de cloruro de potasio; aproximadamente 0,9767 g / l de sulfato de magnesio, al menos aproximadamente 0,13 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H₂O, aproximadamente 6,4 g / l de cloruro de sodio y, opcionalmente, al menos aproximadamente 0,002 g/l de fosfato de sodio (Na₂HPO₄·7H₂O); heptahidrato dibásico.

25 El medio de cultivo comprende además nucleósidos. En una realización, el medio de cultivo comprende los derivados de ácidos nucleicos (nucleósidos), timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,0001 g/l a al menos aproximadamente 0,02 g/l de cada uno de los nucleósidos. En particular, el medio comprende al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina. En otra realización, el medio comprende aproximadamente 0,00045 g/l de timidina y aproximadamente 0,015 g/l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina.

35 En una realización, el medio de cultivo comprende además insulina, transferrina, etanolamina y selenato de sodio. En otra realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,003 g/l de insulina. En otra realización, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,01 g/l de insulina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,05 g/l de transferrina. En otra realización, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,055 g/l de transferrina. En aún otra realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,01 g/l de etanolamina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,02 g/l de etanolamina. En una realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,00004 g/l de selenito de sodio. En otra realización, el medio de cultivo comprende aproximadamente 0,000067g/l de selenito de sodio. En aún otra realización, el medio de cultivo no comprende además insulina, transferrina y etanolamina.

En una realización, el medio de cultivo comprende:

45 *los aminoácidos*: L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; L-alanina; L-asparagina; ácido L-aspártico; ácido L-glutámico; L-prolina; y L-aurina; *las vitaminas*: D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina); *las sales*: cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio; *los nucleósidos (derivados de ácido nucleico)*: timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina; insulina; transferrina; etanolamina; selenito de sodio; y una o más fuentes de energía. En una realización, este medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,0006 g/l a aproximadamente 0,1 g/l de cada uno de los aminoácidos. En otra realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-arginina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,2 g/l de L-glutamina; al menos aproximadamente 0,01 g/l glicina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-isoleucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-Lisina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-metionina; al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-fenilalanina; al menos aproximadamente 0,03 g/l de L-serina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-treonina; al menos aproximadamente 0,009 g/l de L-triptofan; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-tirosina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-valina; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-cisteína; al menos aproximadamente 0,0004 g/l de L-alanina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-asparagina; al menos aproximadamente 0,006 g/l de L-ácido aspártico; al menos 0,03 g/l de L-ácido glutámico; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-prolina; y al menos aproximadamente 0,0003 g/l de L-aurina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende de aproximadamente 5×10^{-6} g/l a aproximadamente 0,015 g/l de cada una de las vitaminas. En una realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,005 g / l de cloruro de calcio anhidro, al menos

- aproximadamente 0,1 g / l de cloruro de potasio; al menos aproximadamente 0,2 g / l de sulfato de magnesio, al menos aproximadamente 0,1 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H₂O y al menos aproximadamente 0,0005 g / l de fosfato de sodio, (Na₂HPO₄·7H₂O); heptahidrato dibásico. En otra realización, el medio comprende al menos aproximadamente 0,0001 g/l a al menos aproximadamente 0,02 g/l de cada uno de los nucleósidos. En una
- 5 realización, el medio comprende al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina. En una realización, el medio de cultivo comprende además al menos 0,005 g/l de insulina y al menos 0,03 g/l de transferrina, al menos 0,01 g/l de etanolamina y al menos aproximadamente 0,00004 g/l de selenito de sodio. La una o más fuentes de energía pueden ser D-glucosa y piruvato de sodio.
- 10 En otra realización, el medio de cultivo comprende: (1) los aminoácidos L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; L-alanina; L-aspargina; L-ácido aspártico; L-ácido glutámico; L-prolina; y L-aurina; (2) las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina); (3) las sales cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio; (4) los nucleósidos timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina; (5) insulina; (6) transferrina; (7) ácido lipoico/ácido tióctico; (8) etanolamina; (9) selenito de sodio; y (10) una o más fuentes de energía.
- 15 En una realización, el medio de cultivo comprende: *los aminoácidos*: L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoleucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; L-alanina; L-aspargina; ácido L-aspártico; ácido L-glutámico; L-prolina; y L-aurina; *las vitaminas*: D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina); *las sales*: cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio; *los nucleósidos (derivados de ácido nucleico)*: timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina; ácido lipoico/toiético; los oligoelementos nitrato férrico, sulfato de cobre, sulfato de cinc; y una o más fuentes de energía. En una realización, este medio de cultivo comprende de aproximadamente 0,0006 g/l a aproximadamente 0,1 g/l de cada uno de los aminoácidos. En otra realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-arginina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,2 g/l de L-glutamina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de glicina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-isoleucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,09 g/l de L-lisina; al menos aproximadamente 0,02 g/l de L-metionina; al menos aproximadamente 0,05 g/l de L-fenilalanina; al menos aproximadamente 0,03 g/l de L-serina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-treonina; al menos aproximadamente 0,009 g/l de L-triptophan; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-tirosina; al menos aproximadamente 0,08 g/l de L-valina; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-cisteína; al menos aproximadamente 0,0004 g/l de L-alanina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-aspargina; al menos aproximadamente 0,006 g/l de L-ácido aspártico; al menos 0,03 g/l de L-ácido glutámico; al menos aproximadamente 0,005 g/l L-prolina; y al menos aproximadamente 0,0003 g/l de L-aurina. En una realización alternativa, el medio de cultivo comprende de aproximadamente 5 x 10⁻⁶ g/l a aproximadamente 0,015 g/l de cada una de las vitaminas. En una realización, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 0,01 g / l de cloruro de calcio anhidro, al menos aproximadamente 0,1 g / l de cloruro de potasio; al menos aproximadamente 0,2 g / l de sulfato de magnesio (anhidro), al menos aproximadamente 0,1 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H₂O y al menos aproximadamente 0,005 g / l de fosfato de sodio, (Na₂HPO₄·7H₂O); heptahidrato dibásico. En otra realización, el medio comprende al menos aproximadamente 0,0001 g/l a al menos aproximadamente 0,02 g/l de cada uno de los nucleósidos. En una
- 20 realización, el medio comprende al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina. La una o más fuentes de energía pueden ser D-glucosa y piruvato de sodio.
- 25 Además del oligoelemento selenito sódico, en ciertas realizaciones, el medio de cultivo comprende además uno o más oligoelementos adicionales. En una realización, el medio comprende además nitrato férrico, sulfato de cobre y sulfato de cinc. En una realización, el medio comprende además nitrato férrico (9H₂O), sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) y sulfato de cinc heptahidrato, (ZnSO₄)₄·7H₂O). Los oligoelementos pueden estar presentes en una cantidad que varía desde aproximadamente 5 x 10⁻⁸ g/l a aproximadamente 3 x 10⁻⁴ g/l de cada uno de los oligoelementos. En una realización alternativa, el medio comprende además aproximadamente 0,001 g/l de nitrato férrico (9H₂O), aproximadamente 9,33 E-08 g/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) y 3,24 E-05 g/l de sulfato de cinc, heptahidrato, (ZnSO₄)₄·7H₂O).
- 30 Además, el medio puede comprender además ácido lipoico/ácido tióctico, que puede comprender al menos aproximadamente 5 x 10⁻⁶ g/l de la solución. En una realización, el medio comprende además aproximadamente 0,000015 g/l de ácido lipoico/ácido tióctico.
- 35 Opcionalmente, el medio puede comprender además putrescina, albúmina, un estabilizador y/o agente espumante. En una realización, la albúmina es seroalbúmina bovina. En una realización, la seroalbúmina bovina se proporciona en forma de AlbuMAX® I disponible en el mercado (Gibco™ Cell Culture, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), que es seroalbúmina bovina rica en lípidos. En otra realización, el medio comprende además el agente
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 667 573 T3

estabilizador/antiespumante disponible en el mercado Pluronic® F68 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ejemplos de realizaciones adecuadas del medio de cultivo se muestran en la tabla siguiente:

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Sales inorgánicas			
Cloruro de calcio anhidro	0,2	Al menos aproximadamente 0,05	0,05 – 0,4
Cloruro de potasio, USP	0,4	Al menos aproximadamente 0,1	0,1 – 0,8
Sulfato de magnesio anhidro	0,9767	Al menos aproximadamente 0,2	0,2 – 1,8
Cloruro de sodio, USP	6,4	Al menos aproximadamente 5	5 – 8
fosfato de sodio, monobásico, H ₂ O, USP	0,133175	Al menos aproximadamente 0,08	0,08 – 0,2
fosfato de sodio, heptahidrato dibásico (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	0,00201	Al menos aproximadamente 0,0005	0,0005 – 0,004
Oligoelementos			
Nitrato férrico (9H ₂ O)	0,0001	Al menos aproximadamente 5 E– 05	0,00002 – 0,0002
Pentahidrato de sulfato de cobre (II) (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	9,33 E–08	Al menos aproximadamente 5 E– 08	5 E–08 – 2 E–07
Sulfato de cinc, heptahidrato, (ZnSO ₄) ₄ ·7H ₂ O)	3,24 E–05	Al menos aproximadamente 1 E– 05	1 E–05 – 5 E–05
Selenato de Sodio (Na ₂ SeO ₃)	0,000067	Al menos aproximadamente 4 E– 05	3 E–0 – 1,2 E–04

ES 2 667 573 T3

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Aminoácidos			
L-arginina	0,09705	Al menos aproximadamente 0,05	0,05 – 0,20
L-cistina	0,06779	Al menos aproximadamente 0,02	0,02 – 0,12
L-cisteína	0,009224	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,020
L-glutamina	0,584	Al menos aproximadamente 0,2	0,2 – 1,0
Glicina	0,031125	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,06
L-histidina	0,048288	Al menos aproximadamente 0,02	0,01 – 0,09
L-iso-leucina	0,163713	Al menos aproximadamente 0,09	0,05 – 0,4
L-leucina	0,163713	Al menos aproximadamente 0,09	0,05 – 0,4
L-lisina	0,16807	Al menos aproximadamente 0,09	0,05 – 0,4
L-metionina	0,036748	Al menos aproximadamente 0,02	0,01 – 0,07
L-fenilalanina	0,073695	Al menos aproximadamente 0,05	0,02 – 0,14
L-serina	0,05145	Al menos aproximadamente 0,03	0,02 – 0,1
L-treonina	0,108609	Al menos aproximadamente 0,08	0,04 – 0,2
L-triptófano	0,018457	Al menos aproximadamente 0,009	0,005 – 0,04
L-tirosina	0,121813	Al menos aproximadamente 0,08	0,04 – 0,25
L-Valina	0,111105	Al menos aproximadamente 0,08	0,04 – 0,25
L-Alanina	0,000668	Al menos aproximadamente 0,0004	0,0002 – 0,0013
L-Aspargina	0,031978	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,07

ES 2 667 573 T3

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
L-Ácido aspártico	0,00803	Al menos aproximadamente 0,006	0,002 – 0,017
L-Ácido glutámico	0,054728	Al menos aproximadamente 0,03	0,02 – 0,1
L-prolina	0,02403	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,05
L-Taurina	0,000844	Al menos aproximadamente 0,0006	0,0003 – 0,002

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Vitaminas			
Pantotenato D-Calcio	0,004338	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,009
Cloruro de colina	0,006094	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,012
Ácido fólico	0,004302	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,009
l-Inositol	0,009568	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,020
Niacinamida	0,004302	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,009
Piridoxal	0,004153	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,009
Riboflavina	0,000431	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,009
Tiamina	0,004304	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,009
d-Biotina	3,75 E-05	Al menos aproximadamente 1 E- 05	1 E-05 – 7 E-05
Piridoxina	1,85 E-05	Al menos aproximadamente 8 E- 06	5 E-06 – 4 E-05
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	0,000102	Al menos aproximadamente 0,00002	0,00002 – 0,0002
Lípidos			
Ácido lipoico/Ácido tióctico	0,000015	Al menos aproximadamente 5 E- 06	5 E-06 – 3 E-05
Etanolamina	0,02	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Proteínas			
Insulina	0,01	Al menos aproximadamente 0,003	0,003 – 0,02
Transferrina	0,055	Al menos aproximadamente 0,03	0,03 – 0,12
Sustratos de energía			
D-glucosa	1	Al menos aproximadamente 0,5	0,5 – 3
Piruvato sódico	0,11	Al menos aproximadamente 0,03	0,03 – 0,2
Derivados de ácido nucleico			
timidina	0,00045	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,0009
Adenosina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,03
Citidina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,03
Uridina	0,015	Al menos aproximadamente 0,05	0,005 – 0,03
Guanosina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,03

Estos medios pueden comprender además seroalbúmina bovina (BSA), putrescina y Pluronic® F68. Específicamente, para la realización A, el medio puede comprender además 3,02 E-05 g/l de putrescina, 2,5 g/l de BSA y 0,015 g/l de Pluronic® F68. De forma similar, para la realización B, la solución de nutrientes sin suero puede comprender además al menos aproximadamente 1 E-05 g/l de putrescina, a 1 g/l de BSA y al menos 0,005 g/l de Pluronic® F68. En una realización, los medios comprenden además putrescina y Pluronic® F68, tales como por ejemplo, 3,02 E-05 g/l de putrescina, 2,5 g/l de BSA y 0,015 g/l de Pluronic® F68.

El medio de cultivo puede comprender además al menos 0,8 g/l de D-glucosa y al menos 0,1 g/l de piruvato sódico. En una realización, el medio de cultivo de la invención comprende además aproximadamente 1 g/l de D-glucosa y aproximadamente 0,11 g/l de piruvato de sodio.

En una realización de la invención, el medio de cultivo se suplementa con suero, tal como, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS) o suero de ternero recién nacido (NCS). El contenido de suero puede variar en concentración desde 0 (un medio sin suero) hasta 20 % del volumen total del medio. En una realización, el medio se suplementa con suero (tal como, por ejemplo, FBS) durante la preparación del medio. En otra realización, el medio se suplementa inmediatamente antes de usar (tal como, por ejemplo, mediante la adición de una solución que comprende suero (por ejemplo, FBS)). En una realización, el medio de cultivo se suplementa preferentemente con aproximadamente 2 a 15 % (v/v) de FBS, como alternativa de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 %, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 %, como alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 %, como alternativa de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %. En las realizaciones seleccionadas, el medio de cultivo se suplementa con aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 % o aproximadamente 15 % de FBS.

B. Soluciones de nutrientes sin suero

Otro aspecto de la divulgación es una solución de nutrientes sin suero que comprende: aminoácidos; vitaminas; sales; nucleósidos; insulina; transferrina; etanolamina; y selenito de sodio. Como se usa en el presente documento, con referencia a la solución nutriente, la expresión "sin suero" significa que la solución nutriente no contiene suero antes de la adición al medio de cultivo. A menos que se indique lo contrario, las cantidades desveladas para los componentes de la solución nutriente sin suero se basan en mediciones del aumento en peso de cada componente después de que se haya agregado la solución de nutrientes sin suero a un cultivo.

En una realización, la solución de nutrientes sin suero comprende los 20 L-aminoácidos esenciales. En otra realización, la solución de nutrientes sin suero comprende los aminoácidos L-arginina, L-cistina, L-cisteína, glicina, L-histidina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, y, opcionalmente, L-alanina, L-aspargina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-aurina. En una realización, la solución comprende desde al menos aproximadamente 0,0001 g/l a al menos aproximadamente 0,03 g/l de cada uno de estos aminoácidos. En otra realización, la solución nutriente sin suero comprende al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-arginina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,0003 g/l de L-cisteína; al menos aproximadamente 0,0005 g/l de glicina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-iso-leucina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-lisina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-metionina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-fenilalanina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-serina; al menos aproximadamente 0,003 g/l de L-treonina; al menos aproximadamente 0,0008 g/l de L-triptófano; al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-tirosina; al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-valina; al menos aproximadamente 0,0001 g/l de L-alanina; al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-aspargina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-ácido aspártico; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-ácido glutámico; al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-prolina y al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-aurina.

En una realización alternativa, la solución de nutrientes sin suero comprende aproximadamente 0,013 g/l L-arginina, HCl; aproximadamente 0,005 g/l de L-Cistina, 2HCl; aproximadamente 0,009 g/l de L-cisteína HCl H₂O; aproximadamente 0,001 g/l de Glicina; aproximadamente 0,006 g/l de L-histidina, HCl, H₂O; aproximadamente 0,059 g/l de L-iso-leucina; aproximadamente 0,059 g/l de L-leucina; aproximadamente 0,022 g/l de L-lisina, HCl; aproximadamente 0,007 g/l de L-metionina; aproximadamente 0,008 g/l de L-fenilalanina; aproximadamente 0,009 g/l de L-serina; aproximadamente 0,013 g/l de L-treonina; aproximadamente 0,002 g/l de L-triptofan; aproximadamente 0,018 g/l de L-tirosina, 2Na, 2H₂O; aproximadamente 0,018 g/l de L-Valina; aproximadamente 0,001 g/l de L-alanina; aproximadamente 0,032 g/l de L-aspargina H₂O; aproximadamente 0,008 g/l de L-ácido aspártico; aproximadamente 0,055 g/l de L-ácido glutámico; aproximadamente 0,024 g/l de L-prolina; y aproximadamente 0,0008 de L-Taurina. Se cree que los aminoácidos ayudan a reponer los aminoácidos consumidos en el cultivo.

La solución de nutrientes sin suero comprende además una o más vitaminas. En una realización, la solución de nutrientes sin suero comprende al menos las siguientes vitaminas: D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; y, opcionalmente, d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina). La solución puede comprender además vitamina C y vitamina A. En una realización, la solución comprende de aproximadamente 5×10^{-6} g/l a 0,001 g/l de cada una de las una o más vitaminas. En una realización, la solución de nutrientes sin suero comprende al menos aproximadamente 0,0001 g/l de pantotenato de D-calcio; al menos aproximadamente 0,0008 g/l de cloruro de colina; al menos aproximadamente 0,0001 g/l de ácido fólico; al menos aproximadamente 0,0008 g/l de l-inositol; al menos aproximadamente 0,0001 g/l de niacinamida; al menos aproximadamente 0,00005 g/l de piridoxal; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de riboflavina; al menos aproximadamente 0,00001 g/l de tiamina; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de d-biotina; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de piridoxina; y al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de vitamina B₁₂ (cianocobalamina). En una realización, la solución nutritiva sin suero comprende aproximadamente 0,000338 g/l pantotenato de D-calcio; aproximadamente 0,002094 g/l de cloruro de colina; aproximadamente 0,000302 g/l de ácido fólico; aproximadamente 0,002568 g/l de l-Inositol; aproximadamente 0,000302 g/l de niacinamida; aproximadamente 0,000153 g/l de piridoxal, HCl; aproximadamente $3,11 \times 10^{-5}$ g/l de riboflavina; aproximadamente 0,000304 g/l de tiamina, HCl; aproximadamente $3,75 \times 10^{-5}$ g/l de d-biotina; aproximadamente $1,85 \times 10^{-5}$ g/l de piridoxina HCl; y aproximadamente 0,000102 g/l de vitamina B₁₂ (cianocobalamina).

Adicionalmente, la solución de nutrientes sin suero comprende una o más sales. En otra realización, la solución comprende de aproximadamente 0,0005 g/l a aproximadamente 0,001 g/l de las sales de fosfato. En una realización alternativa, la solución comprende fosfato de sodio tal como fosfato de sodio, fosfato monobásico y de sodio, heptahidrato dibásico. En aún otra realización, la solución comprende al menos aproximadamente 0,005 g/l de fosfato sódico, monobásico y al menos aproximadamente 0,001 g/l de fosfato sódico, heptahidrato dibásico. En una realización alternativa, la solución comprende aproximadamente 0,008 g/l de fosfato sódico, monobásico y aproximadamente 0,002 g/l de fosfato sódico, heptahidrato dibásico.

La solución de nutrientes sin suero comprende además nucleósidos. En una realización, la solución de nutrientes sin suero comprende los derivados de ácido nucleico timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosa. En particular, la solución comprende al menos aproximadamente 0,0001 g/l a al menos aproximadamente 0,005 g/l de cada uno de

los nucleósidos. En una realización, la solución comprende al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina. En otra realización, la solución comprende aproximadamente 0,0005 g/l de timidina y aproximadamente 0,015 g/l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina.

5 La solución de nutrientes sin suero comprende además insulina, transferrina, etanolamina y selenito de sodio. En una realización, la solución comprende al menos 0,002 g/l, como alternativa aproximadamente 0,01 g/l de insulina. En otra realización, la solución comprende al menos aproximadamente 0,01 g/l, como alternativa aproximadamente 0,01 g/l de transferrina. En una realización alternativa, la solución comprende al menos aproximadamente 0,005 g/l, como alternativa aproximadamente 0,02 g/l de etanolamina. En otra realización, la solución comprende al menos aproximadamente 2×10^{-5} g/l, como alternativa aproximadamente 7×10^{-5} de selenito de sodio.

15 Además del oligoelemento selenito sódico, en ciertas realizaciones, la solución de nutrientes sin suero comprende además uno o más oligoelementos adicionales. En una realización, la solución comprende aproximadamente 3×10^{-8} g/l a aproximadamente 2×10^{-5} g/l de cada uno de los uno o más oligoelementos adicionales. En una realización, la solución comprende además sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de cinc heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). En otra realización, la solución comprende además al menos aproximadamente 3×10^{-8} g/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y al menos aproximadamente 5×10^{-6} g/l de sulfato de cinc, heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). En una realización alternativa, la solución comprende además aproximadamente 9×10^{-8} g/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y aproximadamente 10×10^{-5} g/l de sulfato de cinc, heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

25 Adicionalmente, además de la etanolamina lipídica, la solución de nutrientes sin suero puede comprender además ácido lipoico/ácido tióctico, que puede comprender al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de la solución.

En una realización de la invención, la solución de nutrientes sin suero comprende:

30 *los aminoácidos* L-arginina, L-cistina, L-cisteína, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, l -triptofano, L-tirosina, L-valina, L-alanina, L-aspargina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-aurina;

las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina);

35 *las sales* fosfato sódico monobásico y fosfato sódico heptahidrato dibásico;

los nucleósidos adenosina, citidina, uridina y guanosina;

insulina; transferrina; etanolamina; y selenito de sodio.

40 Esta solución sin suero puede comprender opcionalmente además sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de cinc heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Adicionalmente, la solución sin suero puede comprender opcionalmente además ácido lipoico/ácido tióctico. En una realización, la solución comprende: (1) de aproximadamente 0,0001 g/l a aproximadamente 0,03 g/l de cada uno de los aminoácidos; (2) de aproximadamente 0,00001 g/l a aproximadamente 0,001 g/l de cada una de las vitaminas; (3) al menos aproximadamente 5×10^{-6} g/l de de fosfato sódico, monobásico y al menos aproximadamente 0,001 g/l de fosfato sódico, heptahidrato dibásico (4) al menos aproximadamente 0,0001 g/l de timidina y al menos aproximadamente 0,005 g/l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina; (5) al menos 0,002 g/l de insulina; (6) al menos aproximadamente 0,03 g/l de transferrina; (7) al menos aproximadamente 0,005 g/l de etanolamina y (8) al menos aproximadamente 5×10^{-5} g/l de selenito de sodio. Opcionalmente, esta solución además comprende (9) al menos aproximadamente 7×10^{-8} g/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); (10) al menos aproximadamente 5×10^{-6} g/l de sulfato de cinc, heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); y (11) al menos aproximadamente 1×10^{-6} g/l de ácido lipoico/ácido tióctico.

55 En otra realización de la invención, la solución de nutrientes sin suero comprende aminoácidos, vitaminas, sales, nucleósidos, sulfato de cobre (II), pentahidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sulfato de cinc, heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y ácido lipoico/tióctico. En esa realización, la solución comprende:

60 *los aminoácidos* L-arginina, L-cistina, L-cisteína, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, l -triptofano, L-tirosina, L-valina, L-alanina, L-aspargina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-aurina;

las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina);

65 *las sales* fosfato sódico monobásico y fosfato sódico heptahidrato dibásico; y

los nucleósidos timidina, adenosina, citidina, uridina y guanosina.

En una realización, esta solución nutriente sin suero comprende al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-arginina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-cistina; al menos aproximadamente 0,0003 g/l de L-cisteína, al menos aproximadamente 0,0005 g/l de glicina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-histidina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-isoleucina; al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-leucina; al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-lisina; al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-metionina, al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-fenilalanina, al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-serina, al menos aproximadamente 0,003 g/l de L-treonina, al menos aproximadamente 0,0008 g/l de L-triptófano, al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-tirosina, al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-valina, al menos aproximadamente 0,0001 g/l de L-alanina, al menos aproximadamente 0,005 g/l de L-aspargina, al menos aproximadamente 0,002 g/l de L-ácido aspártico, al menos aproximadamente 0,01 g/l de L-ácido glutámico, al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-prolina y al menos aproximadamente 0,008 g/l de L-aurina. En otra realización, esta solución de nutrientes sin suero comprende además al menos aproximadamente 0,0001 g/l de pantotenato de D-calcio; al menos aproximadamente 0,0008 g/l de cloruro de colina; al menos aproximadamente 0,0001 g/l de ácido fólico; al menos aproximadamente 0,0008 g/l de l-inositol; al menos aproximadamente 0,0001 g/l de niacinamida; al menos aproximadamente 0,00005 g/l de piridoxal; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de riboflavina; al menos aproximadamente 0,00001 g/l de tiamina; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de d-biotina; al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de piridoxina; y al menos aproximadamente 1×10^{-5} g/l de vitamina B12 (cianocobalamina). En una realización alternativa, esta solución comprende además al menos aproximadamente 0,0001 g / l de timidina y al menos aproximadamente 0,01 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina. En otra realización esta solución además comprende al menos aproximadamente 3×10^{-8} g/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), aproximadamente 5×10^{-5} g/l de sulfato de cinc, heptahidrato, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); y aproximadamente 2×10^{-5} g/l de ácido lipoico/ácido tióctico.

Opcionalmente, las soluciones de nutrientes sin suero pueden comprender además putrescina, seroalbúmina bovina, un estabilizante y/o agente espumante. En una realización, la seroalbúmina bovina se proporciona en forma de AlbuMAX® I disponible en el mercado (Gibco™ Cell Culture, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), que es seroalbúmina bovina rica en lípidos. En otra realización, la solución de nutrientes sin suero comprende el agente estabilizador/antiespumante disponible en el mercado Pluronic® F68 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Ejemplos de realizaciones adecuadas de la solución de nutrientes sin suero en la tabla siguiente:

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Sales inorgánicas			
fosfato de sodio, monobásico, H ₂ O, USP	0,008175	Al menos aproximadamente 0,001	0,001 – 0,016
fosfato de sodio, heptahidrato dibásico (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	0,00201	Al menos aproximadamente 0,0005	0,0005 – 0,004
Oligoelementos			
Pentahidrato de sulfato de cobre (II) (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	9,33 E-08	Al menos aproximadamente 3 E- 08	3 E-08 – 2 E-07
Sulfato de cinc, heptahidrato, (ZnSO ₄) ₄ ·7H ₂ O)	3,24 E-05	Al menos aproximadamente 5 E- 06	5 E-06 – 7 E-05
Selenato de sodio Na ₂ SeO ₃	0,000067	Al menos aproximadamente 0,00002	0,00002 – 0,00014

ES 2 667 573 T3

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Aminoácidos			
L–Arginina, HCl	0,01305	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,03
L–Cistina, 2HCl	0,00522	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,00522
L–Cisteína HCl H ₂ O	0,009224	Al menos aproximadamente 0,003	0,003 – 0,02
Glicina	0,001125	Al menos aproximadamente 0,0005	0,0005 – 0,0025
L–Histidina, HCl, H ₂ O	0,006288	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,015
L–isoleucina	0,058913	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,12
L–leucina	0,058913	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,12
L–Lisina, HCl	0,02187	Al menos aproximadamente 0,008	0,008 – 0,05
L–metionina	0,006748	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,015
L–fenilalanina	0,007695	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,02
L–serina	0,00945	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,02
L–treonina	0,013409	Al menos aproximadamente 0,003	0,003 – 0,03
L–triptófano	0,002457	Al menos aproximadamente 0,0008	0,0008 – 0,005
L–tirosina, 2Na, 2H ₂ O	0,018023	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04
L–valina	0,017505	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04
L–Alanina	0,000668	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,002
L–Aspargina H ₂ O	0,031978	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,07
L–Ácido aspártico	0,00803	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,02
L–Ácido glutámico	0,054728	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,12

ES 2 667 573 T3

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
L-prolina	0,02403	Al menos aproximadamente 0,008	0,008 – 0,05
L-Taurina	0,000844	Al menos aproximadamente 0,0002	0,0002 – 0,002
Vitaminas			
Pantotenato D-Calcio	0,000338	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,0007
Cloruro de colina	0,002094	Al menos aproximadamente 0,0008	0,0008 – 0,005
Ácido fólico	0,000302	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,0007
I-Inositol	0,002568	Al menos aproximadamente 0,0008	0,0008 – 0,005
Niacinamida	0,000302	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,0007
Piridoxal, HCl	0,000153	Al menos aproximadamente 0,00005	0,00005 – 0,0004
Riboflavina	3,11 E-05	Al menos aproximadamente 1 E- 05	1 E-05 – 7 E-05
tiamina•HCl	0,000304	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,0007
d-Biotina	3,75 E-05	Al menos aproximadamente 1 E- 05	1 E-05 – 8 E-05
Piridoxina. HCl	1,85 E-05	Al menos aproximadamente 5 E- 06	5 E-06 – 4 E-05
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	0,000102	Al menos aproximadamente 0,00002	0,00002 – 0,00025

	Realización A Cantidad (g/l)	Realización B Cantidad (g/l)	Realización C Cantidad (g/l)
Lípidos			
Ácido lipoico/Ácido tióctico	0,000015	Al menos aproximadamente 0,000005	0,000005 – 0,00004
Etanolamina HCl	0,02	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,05
Proteínas			
Insulina	0,01	Al menos aproximadamente 0,002	0,002 – 0,025
Transferrina	0,055	Al menos aproximadamente 0,01	0,01 – 0,15
Derivados de ácido nucleico			
timidina	0,00045	Al menos aproximadamente 0,0001	0,0001 – 0,001
Adenosina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04
Citidina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04
Uridina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04
Guanosina	0,015	Al menos aproximadamente 0,005	0,005 – 0,04

Estas soluciones de nutrientes sin suero pueden comprender además seroalbúmina bovina (BSA), putrescina y Pluronic® F68. Específicamente, para la realización A, la solución de nutrientes sin suero puede comprender además 3,02 E-05 g/l de putrescina, 2,5 g/l de BSA y 0,015 g/l de Pluronic® F68. De forma similar, para la realización B, la solución de nutrientes sin suero puede comprender además al menos aproximadamente 1 E-05 g/l de putrescina, a 1 g/l de BSA y al menos 0,005 g/l de Pluronic® F68. En una realización preferente, las soluciones de nutrientes sin suero comprenden además putrescina y Pluronic® F68.

En la realización, la solución de nutrientes sin suero comprende selenato de sodio, etanolamina, insulina, transferrina, timidina, adenosina, citidina, uridina, guanosina y albúmina de suero (por ejemplo, seroalbúmina bovina).

Opcionalmente, la solución de nutrientes sin suero puede comprender además uno o más sustratos de energía, tales como por ejemplo, glucosa y/o piruvato.

En una realización de la invención, el medio de cultivo y/o la solución de nutrientes sin suero no contienen factores añadidos exógenamente que promueven el crecimiento de células indiferenciadas. En una realización preferente, el medio de cultivo y/o la solución de nutrientes sin suero no comprenden un factor de crecimiento de fibroblastos, tal como, por ejemplo, FGF básico o FGF-4.

II. Células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (hUTC)

Como se ha tratado anteriormente, en ciertas realizaciones de la invención, el medio de cultivo y las soluciones de nutrientes sin suero se pueden usar para cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical humano aisladas ("hUTC" o "UTC"). Las poblaciones de UTC y UTC adecuadas para su uso con el medio de cultivo, solución de nutrientes sin suero, kits y procedimientos de la presente invención se describen con detalle en el presente documento detallado a continuación, así como las patentes de Estados Unidos n.º 7.510.873, 7.524.489 y la solicitud de publicación de Estados Unidos n.º 2005/005863.

A. Aislamiento y crecimiento de células derivadas de tejido de cordón umbilical

Según los procedimientos descritos en el presente documento, se recupera un cordón umbilical de mamífero después o poco después de finalizar una gestación a término o una gestación prematura, por ejemplo, después de su expulsión tras el nacimiento. El tejido posparto puede transportarse desde el lugar de nacimiento a un laboratorio en un recipiente estéril, tal como un matraz, vaso de precipitados, placa de cultivo o bolsa. El recipiente puede contener una solución o medio, incluyendo, pero sin limitaciones, una solución salina, tal como, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (también denominado medio esencial mínimo de Dulbecco) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier solución utilizada para el transporte de órganos utilizados para el trasplante, tal como la solución de la Universidad de Wisconsin o solución perfluoroquímica. Pueden añadirse al medio o tampón uno o más antibióticos y/o antimicóticos, tales como, pero sin limitaciones a los mismos, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina. El tejido posparto puede aclararse con una solución anticoagulante, tal como una solución que contenga heparina. Es preferente mantener el tejido a aproximadamente 4 °C-10 °C antes de extraer las UTC. Es aún más preferente no haber congelado el tejido antes de extraer las UTC.

El aislamiento de las UTC se produce preferentemente en un ambiente aséptico. Se separa el cordón umbilical de la placenta por medios conocidos en la técnica. Como alternativa, el cordón umbilical y la placenta se utilizan sin separación. La sangre y los desechos se eliminan, preferiblemente, del tejido posparto antes del aislamiento de las UTC. Por ejemplo, el tejido posparto puede lavarse con solución tampón, incluyendo, pero sin limitaciones, solución salina tamponada con fosfato. El tampón de lavado puede comprender también uno o más antimicóticos y/o antibióticos, tales como, pero no limitados a, penicilina, estreptomycin, anfotericina B, gentamicina y nistatina.

El tejido posparto que comprende un cordón umbilical o un fragmento o sección del mismo se desagrega mediante fuerza mecánica (trituration o fuerzas de cizallamiento). En una realización preferida en el presente documento, el procedimiento de aislamiento también utiliza un proceso de digestión enzimática. En la materia se conocen muchas enzimas útiles para el aislamiento de células individuales a partir de matrices de tejido complejas para facilitar el crecimiento en cultivo. Las enzimas de la digestión varían desde ligeramente digestivas (por ejemplo, desoxirribonucleasas y la proteasa neutra, dispasa) a fuertemente digestivas (por ejemplo, papaína y tripsina), y están disponibles comercialmente. Una lista no exhaustiva de enzimas compatibles con la presente invención incluye actividades enzimáticas mucolíticas, metaloproteasas, proteasas neutras, serina proteasas (tales como tripsina, quimotripsina o elastasa) y desoxirribonucleasas. Actualmente se prefieren las actividades enzimáticas seleccionadas de metaloproteasas, proteasas neutras y actividades mucolíticas. Por ejemplo, se sabe que las colagenasas son útiles para aislar varias células de tejidos. Las desoxirribonucleasas pueden digerir ADN monocatenario y pueden minimizar el aglutinamiento celular durante el aislamiento. Los procedimientos preferidos implican un tratamiento enzimático con, por ejemplo, colagenasa y dispasa, o colagenasa, dispasa e hialuronidasa. En ciertas realizaciones, se usa una mezcla de colagenasa y la dispasa de proteasa neutra en la etapa de disociación. Realizaciones más específicas emplean la digestión en presencia de al menos una colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y cualquiera de las actividades de proteasa, dispasa y termolisina. Aún otras realizaciones emplean la digestión tanto con las actividades de las enzimas colagenasa y dispasa. También se utilizan procedimientos que incluyen la digestión con una actividad hialuronidasa además de las actividades de colagenasa y dispasa. El experto en la técnica apreciará que muchos de estos tratamientos enzimáticos son conocidos en la técnica para aislar células de diversas fuentes de tejido. Por ejemplo, las mezclas de enzimas para la disociación de tejidos vendidas bajo el nombre comercial de LIBERASE (Roche, Indianapolis, Ind.) son adecuadas para su uso en los presentes procedimientos. Se conocen otras fuentes de enzimas y el experto en la materia puede obtener también dichas enzimas directamente de sus fuentes naturales. El experto en la técnica también está preparado para evaluar enzimas o combinaciones enzimáticas nuevas o adicionales por su utilidad en el aislamiento de las células de la invención. Los tratamientos enzimáticos preferentes tienen una duración de 0,5 horas, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas, o más. En otras realizaciones preferentes, el tejido se incuba a 37 °C durante el tratamiento enzimático de la etapa de disgregación.

En algunas formas de realización de la invención, el tejido posparto se separa en fracciones que comprenden varios aspectos del tejido, tal como aspectos neonatos, neonatos/maternos y maternos de, por ejemplo, la placenta. A continuación, las secciones separadas se disocian mediante disociación mecánica y/o enzimática según los procedimientos descritos en el presente documento. Las células de linaje materno o neonatal pueden identificarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante análisis del cariotipo o hibridación *in situ* para un cromosoma Y.

Pueden utilizarse células aisladas o tejido de cordón umbilical a partir del que se multiplican las UTC para iniciar, o sembrar, cultivos celulares. Las células aisladas se transfieren a recipientes estériles para cultivo tisular recubiertos o no recubiertos con una matriz extracelular o ligandos tales como laminina, colágeno (por ejemplo, natural o desnaturalizado), gelatina, fibronectina, y otras proteínas de la matriz extracelular. Además de los medios de cultivo divulgados en el presente documento, una UTC se puede cultivar en cualquier medio de cultivo capaz de sustentar el crecimiento de las células tales como, pero sin limitaciones, DMEM (con alto o bajo contenido de glucosa), DMEM avanzado, DMEM/MCDB 201, medio basal de Eagle, medio F10 de Ham (F10), medio F12 de Ham (F12), medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de crecimiento de células madre mesenquimatosas (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 y medio libre de suero/medio vendido con el nombre comercial CELL-GRO-FREE (Mediatech, Inc.,

Herndon, Va). El medio de cultivo puede complementarse con uno o más componentes incluidos, por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), preferentemente aproximadamente al 2 %-15 % (v/v); suero equino (ES); suero humano (HS)); beta-mercaptoetanol (BME), preferentemente aproximadamente al 0,001 % (v/v); uno o más factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF), factor de crecimiento factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor inhibidor de leucocitos (LIF) y eritropoyetina (EPO); aminoácidos, incluida L-valina; y uno o más antibióticos y/o antimicóticos para controlar la contaminación microbiana, tales como, por ejemplo, penicilina G, sulfato de estreptomina, anfotericina B, gentamicina y nistatina, ya sea solos o en combinación. El medio de cultivo puede comprender medio de crecimiento, como se define en los ejemplos.

Las células se siembran en recipientes de cultivo a una densidad que permita el crecimiento celular. En una realización preferente, las células se cultivan a aproximadamente 0 a aproximadamente 5 % n volumen de CO₂ en aire. En algunas realizaciones preferentes, las células se cultivan a aproximadamente 2 a aproximadamente 25 % d O₂ en aire, preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 % e O₂ en el aire. Las células se cultivan, preferentemente, a una temperatura de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, más preferentemente se cultivan a 37 °C. Las células se cultivan preferentemente en una incubadora. El medio en el recipiente de cultivo puede ser estático o agitado, por ejemplo, utilizando un biorreactor. Las UTC se cultivan preferentemente en condiciones de bajo estrés oxidativo (por ejemplo, con la adición de glutatión, ácido ascórbico, catalasa, tocoferol, N-acetilcisteína). "Bajo estrés oxidativo" se refiere a condiciones de daño mínimo o nulo por radicales libres a las células cultivadas.

Los procedimientos para seleccionar el medio de cultivo más apropiado, la preparación del medio y las técnicas de cultivo celular son bien conocidos en la técnica y se describen en diversas fuentes, incluidas Doyle y col., (eds.), 1995, *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester; y Ho y Wang (eds.), 1991, *Animal Cell Bioreactors*, Butterworth-Heinemann, Boston.

Después de cultivar las células aisladas o los fragmentos de tejido durante un período de tiempo suficiente, las UTC se habrán multiplicado, ya sea como resultado de la migración desde el tejido posparto o la división celular, o ambos. En algunas realizaciones de la invención, la UTC se somete a pases, o se llevan a un recipiente de cultivo separado que contiene medio recién preparado del mismo o diferente tipo que el utilizado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse por mitosis. Las células de la invención pueden utilizarse en cualquier momento entre el pase 0 y la senescencia. Preferentemente, las células se someten a pases entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25 veces, más preferentemente se someten a pases de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 veces, y preferentemente se someten a pases 10 u 11 veces. Pueden realizarse la clonación y/o subclonación para confirmar que se ha aislado una población clonal de células.

En ciertas realizaciones, los diferentes tipos de células presentes en el tejido posparto se fraccionan en subpoblaciones a partir de las que pueden aislarse las UTC. La fracción o selección puede lograrse utilizando técnicas estándar de separación de células incluidas, pero no sin limitaciones, tratamiento enzimático para disociar el tejido posparto en sus células componentes, seguido de clonación y selección de tipos específicos de células, por ejemplo, pero sin limitaciones, la selección en base a marcadores morfológicos y/o bioquímicos; crecimiento selectivo de células deseadas (selección positiva), destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa); separación en base a la aglutinabilidad celular diferencial en la población mixta como, por ejemplo, con aglutinina de soja; procedimientos de congelación y descongelación; propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta; filtración; centrifugación convencional y zonal; decantación centrífuga (centrifugación contracorriente); separación por gravedad unitaria; distribución en contracorriente; electroforesis; y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Para una revisión de las técnicas de selección clonal y separación celular, véase Freshney, 1994, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 3ª Ed., Wiley-Liss, Inc., New York.

El medio de cultivo se cambia según sea necesario, por ejemplo, mediante aspiración cuidadosa del medio de la placa, por ejemplo, con una pipeta, y la reposición con medio recién preparado. Se continúa incubando hasta que se acumula un número o densidad suficiente de células en la placa. Las secciones de tejido explantado original pueden sacarse y las células restantes tripsinizarse utilizando técnicas convencionales o utilizando un rascador de células. Después de la tripsinización, se recogen las células, se llevan a un medio recién preparado y se incuban como se ha indicado anteriormente. En algunas formas de realización, el medio se cambia al menos una vez aproximadamente 24 horas después de la tripsinización para eliminar las células flotantes. Se considera que las células que permanecen en el cultivo son UTC.

La UTC se pueden crioconservar. Por consiguiente, las UTC para la transferencia autóloga (para la madre o el niño) pueden derivarse de tejidos posparto apropiados después del nacimiento de un niño, y, después, crioconservarse para estar disponibles en caso de que sean más tarde necesarios para el trasplante.

B. Características de las células derivadas de tejido de cordón umbilical

Las UTC pueden caracterizarse, por ejemplo, por sus características de crecimiento (por ejemplo, capacidad de

- duplicación de la población, tiempo de duplicación, pases hasta la senescencia), mediante análisis del cariotipo (por ejemplo, linaje materno o neonatal), citometría de flujo (por ejemplo, análisis FACS), inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica (por ejemplo, para la detección de epítomos), perfiles de expresión génica (por ejemplo, matrices génicas; reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, PCR con transcriptasa inversa, PCR en tiempo real y PCR convencional)), matrices de proteínas, secreción de proteínas (por ejemplo, ensayo de coagulación de plasma o análisis de medio acondicionado de PDC, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), reacción linfocitaria mixta (por ejemplo, como medida de la estimulación de PBMC) y/u otros procedimientos conocidos en la materia.
- 10 Los ejemplos de UTC adecuadas derivadas de tejido de cordón umbilical se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA 20110) el 10 de junio de 2004 y se les asignaron números de registro ATCC de la siguiente manera: (1) a la denominación de cepa UMB 022803 (P7) se le asignó el número de registro PTA-6067; y (2) a la denominación de cepa UMB 022803 (P17) se le asignó el número de registro PTA- 6068.
- 15 En diversas realizaciones, las UTC poseen una o más de las siguientes características de crecimiento: (1) requieren L-valina para el crecimiento en cultivo; (2) son capaces de crecer en atmósferas que contienen oxígeno desde aproximadamente 5 % hasta al menos aproximadamente 20 % (3) tienen el potencial de al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo antes de alcanzar la senescencia; y (4) se unen y se expanden en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto, en el que el recipiente de cultivo de tejidos recubiertos comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina.
- 20 En ciertas realizaciones, las UTC poseen un cariotipo normal, que se mantiene a medida que las células se someten a pases. Los procedimientos para la realización cariotipo están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica.
- 25 En otras realizaciones, las UTC pueden caracterizarse por la producción de ciertas proteínas, incluyendo (1) producción de al menos uno de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso; y (2) producción de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, PD-L2 y HLA-A, B, C, según se detecta por citometría de flujo. En otras realizaciones, las UTC pueden caracterizarse por falta de producción de al menos uno de los marcadores de superficie célula rCD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G y HLA-DR, DP, DQ, como se detecta por citometría de flujo. Son particularmente preferidas las células que producen al menos dos factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso. Son particularmente preferidas las células que producen las tres proteínas de factor tisular, vimentina y alfa-actina de músculo liso.
- 30 En otras realizaciones, las UTC pueden caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para un gen que codifica al menos una de interleucina 8; reticulón 1; ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (actividad estimulante del crecimiento del melanoma, alfa); ligando 6 de quimiocina (motivo C - X - C) (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos); ligando 3 de quimiocina (motivo C - X - C); factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa.
- 35 En aún otras realizaciones, las UTC pueden caracterizarse por la expresión génica, que en relación con una célula humana que es fibroblasto, una célula madre mesenquimatosa o una célula de la médula ósea de cresta ilíaca, se reduce para un gen que codifica al menos uno de: homeocaja 2 de estatura baja; proteína del choque térmico de 27 kDa; ligandos 12 de quimiocina (motivo C-X-C) (factor 1 derivado de células estromales); elastina (estenosis aórtica supralvalvular, síndrome de Williams-Beuren); ARNm de Homo sapiens; ADNc de DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022); homeocaja 2 del mesénquima (homeocaja específica del cese de crecimiento); homólogo 1 de la homeocaja sine oculis (Drosophila); alfa B cristalina; activador 2 asociado "disheveled" de la morfogénesis 2; proteína DKFZP586B2420; similar a neuralina 1; tetranectina (proteína de unión a plasminógeno); dominio 3 de homología con src (SH3) y rico en cisteínas; colesterol 25- hdroxilasa; factor de transcripción relacionado con el enanismo 3; receptor de interleucina 11, alfa; potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa; homólogo Frizzled 7 (Drosophila); gen hipotético BC008967; colágeno, tipo VIII, alfa 1; tenascina C (hexabraquina) ; proteína 5 de la homeocaja iroquesa; hefaestina; integrina, beta 8; glucoproteína 2 de vesículas sinápticas; neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1; proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de 36kDa; ADNc de Homo sapiens FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744; factor 1 similar a receptores de citocinas; canal activado por calcio de conductancia intermedia/pequeña de potasio, subfamilia N, miembro 4; integrina, beta 7; co-activador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; homólogo 2 de la homeocaja de sine oculis (Drosophila); ; proteína KIAA1034; proteína 5 de membrana asociada a vesícula (miobrevina) ; proteína 1 de la matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF; respuesta 3 de crecimiento temprano; homeocaja 5 de distal-less; proteína hipotética FLJ20373; miembro C3 de la familia 1 de la aldo-ceto reductasa (3-alfa hidroxiesteroide deshidrogenasa, tipo II) ; biglicano; coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) ; fibronectina 1; proencefalina; integrina, beta similar a 1 (con dominios de repetición similares a EGF); clon de ADNc de inserto de longitud completa de ARNm de Homo sapiens EUROIMAGE 1968422; EphA3; proteína KIAA0367; receptor C de péptido natriurético/guanilato ciclasa C (receptor C de péptido natriurético); proteína hipotética FLJ14054; ARNm de Homo sapiens; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222) ; similar a la proteína 3 de interacción con
- 60
- 65

BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa; proteína 1 de unión a AE; y/o polipéptido 1 de la subunidad VIIa de citocromo c oxidasa (músculo).

5 En otras realizaciones, las UTC pueden caracterizarse, cuando están en cultivo, por la secreción de al menos uno de MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1b, I309, MDC RANTES y TIMP1. Además, las UTC pueden caracterizarse, cuando están en cultivo, por la falta de secreción de al menos uno de TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1A y VEGF, según se detecta mediante ELISA.

10 En algunas realizaciones, las UTC se obtienen de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, requieren L-valina para crecimiento, pueden crecer en al menos aproximadamente 5 % de oxígeno, y comprenden al menos Una de las siguientes características: potencial para al menos aproximadamente 40 duplicaciones en cultivo; unión y expansión en un recipiente de cultivo de tejidos recubierto o no recubierto que comprende un recubrimiento de gelatina, laminina, colágeno, poliornitina, vitronectina o fibronectina; producción de vimentina y alfa-actina de músculo liso; producción de CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90; y expresión de un gen, que con respecto a una célula humana que es un fibroblasto, una célula madre mesenquimatosas o una célula de la médula ósea de cresta ilíaca, se incrementa para un gen que codifica la interleucina 8 y el reticulón 1. En algunas realizaciones, tales UTC no producen CD45 y CD117.

20 En realizaciones preferidas, la célula comprende dos o más de las características de crecimiento, producción de marcador/proteína de superficie, expresión génica o de secreción de sustancias mencionadas anteriormente. Es más preferida una célula que comprende, tres, cuatro, cinco o más de las características. Son aún más preferentes es una UTC que comprende seis, siete, u ocho o más de las características. Es aún más preferente una célula que comprende todas las características anteriores.

25 Entre las células que se prefieren actualmente para su uso con la invención en varios de sus aspectos son células posparto que tienen las características descritas anteriormente y, más particularmente, aquellas en las que las células tienen cariotipos normales y mantienen cariotipos normales con pases, y, además, en las que las células expresan cada uno de los marcadores CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa, y HLA-A, B, C, en los que las células producen las proteínas inmunológicamente detectables que corresponden a los marcadores enumerados.

30 Aún más preferidas son las células que, además de las anteriores, no producen proteínas que correspondan a ninguno de los marcadores CD31, CD34, CD45, CD117, CD141, o HLA-DR, DP, DQ, según se detecta mediante citometría de flujo.

35 En una realización, las UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, carecen de producción de CD 117 o CD45, y no expresan hTERT ni telomerasa. Estas UTC expresan opcionalmente receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, reticulón, ligando 3 de receptor de quimiocina y/o proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o no expresan CD31 o CD34; y/o expresan, en relación con un fibroblasto humano, células madre mesenquimatosas o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o reticulón 1; y/o expresan CD10, CD13, CD44, CD73 y CD90.

45 En otra realización, las UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresar CD13 and CD90 y no expresan CD34 y CD117. Opcionalmente, estas células no expresan hTERT o telomerasa. En aún otra realización, las células también expresan CD10, CD44 y CD43. En una realización alternativa, las células tampoco expresan CD45 y CD31. Estas UTC opcionalmente (i) expresan el receptor de lipoproteína 1 de baja densidad oxidado, reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) expresan, con respecto a fibroblastos humanos, células madre mesenquimatosas o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1.

50 En otra realización, las UTC se aíslan de tejido de cordón umbilical sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresar CD13, CD90 y HLA-ABC, y no expresan CD34, CD117 y HLA-DR. Opcionalmente, estas células tampoco expresan hTERT ni telomerasa. En una realización, las células también expresan CD10, CD44 y CD43. En una realización alternativa, las células tampoco expresan CD45 y CD31. Estas UTC opcionalmente (i) expresan el receptor de lipoproteína 1 de baja densidad oxidado, reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y/o (ii) expresan, con respecto a fibroblastos humanos, células madre mesenquimatosas o células de médula ósea de cresta ilíaca, niveles elevados de interleucina 8 o reticulón 1.

60 En una realización alternativa, las UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, y tienen las siguientes características: (1) expresan CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresan CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117, y (3) no expresan hTERT ni telomerasa. En una realización alternativa, las UTC se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, pueden autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, y tienen las siguientes características: (1) expresan CD10, CD13, CD44, CD90 y HLA-ABC; (2) no expresan CD31, CD34, CD45, HLA-DR y CD117; (3) no expresa hTERT ni telomerasa; (4) expresan el

65

receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada, reticulón, el ligando 3 del receptor de quimiocina y/o la proteína quimiotáctica de granulocitos; y (4) expresan, en relación con un fibroblasto humano, célula madre mesenquimatosas o célula de médula ósea de cresta ilíaca, niveles aumentados de interleucina 8 o retículo 1.

5 En una realización, las hUTC se proporcionan como una población de células, que puede ser homogénea. En algunas realizaciones, la población de células puede ser heterogénea. Una población de células heterogénea de la invención puede comprender al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 95 % de UTC de la invención. Las poblaciones de células heterogéneas de la invención pueden comprender además citoblastos u otras células progenitoras, tales como mioblastos u otras células progenitoras de músculo, hemangioblastos o células precursoras de vasos sanguíneos; o pueden comprender además células de músculo esquelético completamente diferenciadas, células de músculo liso, pericitos o células endoteliales de vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, la población es sustancialmente homogénea, es decir, comprende sustancialmente solo UTC (preferentemente al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más UTC). La población de células homogénea de la invención está compuesta por células derivadas de cordón umbilical. Las poblaciones de células derivadas del cordón umbilical homogéneas están, preferentemente, libres de células de linaje materno. La homogeneidad de una población de células puede lograrse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo) o por expansión clónica según procedimientos conocidos. Las poblaciones de UTC homogéneas preferidas pueden comprender una línea celular clonal de células derivadas de parto.

20 En una realización, las hUTC después del cultivo tienen sustancialmente las mismas características (por ejemplo, perfil de marcador y/o perfil de expresión génica) que las hUTC antes del cultivo. En una realización alternativa, las hUTC después del cultivo tienen las mismas características (por ejemplo, perfil de marcador y/o perfil de expresión génica) que las hUTC antes del cultivo. En una realización, las hUTC después del cultivo tienen las mismas características que las hUTC antes de cultivar para al menos CD13, CD34, CD90 y CD117.

III. Otras células adecuadas

30 Como se ha tratado anteriormente, en ciertas realizaciones de la invención, el medio de cultivo y las soluciones de nutrientes sin suero se pueden usar para cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical humano aisladas ("hUTC" o "UTC"). Además, el medio de cultivo y las soluciones de nutrientes sin suero se pueden usar para cultivar otras células dependientes de anclaje.

35 En una realización de la divulgación, el medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero se utilizan para cultivar otras células dependientes de anclaje tales como células derivadas de placenta. Los ejemplos de otras células dependientes de anclaje incluyen, pero sin limitaciones, células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea, progenitores derivados de médula ósea de células madre mesenquimatosas, células derivadas de tejidos no medulares, tales como tejido adiposo, tejido muscular, vasos sanguíneos, incluyendo células derivadas de las arterias mamarias internas, células derivadas de la pulpa dental de los dientes. Además, se ha demostrado que el líquido amniótico es una fuente muy rica de células madre dependientes de anclaje. Otro ejemplo de células dependientes de anclaje son los fibroblastos, incluidos los fibroblastos de prepucio neonatal.

IV. Procedimientos de cultivo

45 Otra realización de la invención son los procedimientos de cultivo de células que comprenden el uso del medio acondicionado y la solución de nutrientes sin suero. Los procedimientos pueden utilizar botellas de cultivo rotatorias, matraces de centrifugación y/o microvehículos. En realizaciones preferentes, los procedimientos se usan para cultivar células dependientes de anclaje, tales como por ejemplo, células hUTC, y requieren microvehículos.

50 En particular, el procedimiento comprende cultivar hUTC con el medio acondicionado y la solución de nutrientes sin suero de la invención sin la necesidad de intercambio de suero. Como se ha tratado anteriormente, las UTC se pueden cultivar diversos medios de cultivo. Los procedimientos de la invención reducen de forma óptima el uso de suero y aumentan la productividad volumétrica para reducir el coste de fabricación de las composiciones que comprenden células dependientes de anclaje, por ejemplo, hUTC. Además, el procedimiento permite el crecimiento de las células (por ejemplo, hUTC) sin intercambio de medio.

60 Los procedimientos de ejemplo de cultivo de células en botellas de cultivo rotatorias y microvehículos se describen en las solicitudes de publicación de Estados Unidos n.º 2007/0141700 y 2008/0166328. Ejemplos de botellas de cultivo rotatorias adecuadas, matraces de centrifugación, microvehículos, características de los mismos y parámetros de cultivo adecuados se analizan a continuación.

A. Botellas de cultivo rotatorias

65 Los sistemas de cultivo en botella rotatoria son conocidos en la técnica del cultivo celular. Como se usa en el presente documento, los sistemas de cultivo en botella rotatoria comprenden al menos una línea celular de interés, medio de crecimiento, botellas de cultivo rotatorias, un aparato para hacer girar las botellas y medios para cosechar

las células.

Los sistemas de cultivo en botella de cultivo rotatoria típicamente comprenden además medios para controlar la temperatura durante la incubación, así como medios para manipular asépticamente los cultivos, por ejemplo, durante la siembra inicial de las botellas con células, o durante las transferencias posteriores. La cosecha de las células puede lograrse mediante tratamiento enzimático, tal como con tripsina, tripsina-EDTA, dispasa y colagenasa u otras enzimas o combinaciones de enzimas con o sin otros componentes. Se pueden utilizar otros productos comerciales, tales como, pero sin limitación, TrypLE™ Express (Gibco, Inc.). Las células también se pueden cosechar mediante operaciones manuales que incluyen, por ejemplo, centrifugación discontinua, o la cosecha puede automatizarse.

En una realización, las botellas se llenan con aproximadamente 100-300 ml de medio de crecimiento, en otras realizaciones se usan aproximadamente 100-200 ml. En una realización alternativa, se introducen aproximadamente 100-120 ml, o incluso 105-115 ml en las botellas. En otras realizaciones, las botellas se llenan con aproximadamente 112 ml de medio de crecimiento para lograr duplicaciones de población máximas. En una realización, las botellas se siembran con aproximadamente 2.500 a aproximadamente 10.000 células/cm². En una realización, se usa el extremo inferior de ese intervalo, por ejemplo, la siembra es con menos de aproximadamente 3.000 células por centímetro cuadrado. Las botellas de siembra se rotan durante la unión y el crecimiento. La velocidad de rotación puede ajustarse entre aproximadamente 0,5 a 1 rpm. Preferentemente, la rotación está entre aproximadamente 0,75 y 1 rpm. Más preferentemente, las botellas giran a aproximadamente 0,8 a 1 rpm.

En otra realización, las botellas de cultivo rotatorias se llenan con aproximadamente 100-300 ml de medio de crecimiento, preferentemente se usan aproximadamente 300 ml. Las botellas se siembran con aproximadamente 2.500 a aproximadamente 10.000 células por centímetro cuadrado. En una realización, se usa el extremo inferior de ese intervalo, por ejemplo, la siembra es con menos de aproximadamente 3.000 células por centímetro cuadrado. Todavía más preferentes son las realizaciones en las que la siembra es de aproximadamente 2500 células/cm². Las botellas sembradas se rotan durante la unión y el crecimiento. La velocidad de rotación se ajusta entre aproximadamente 0,5 a 1 rpm. Preferentemente, la rotación está entre aproximadamente 0,75 y 1 rpm. Más preferentemente, las botellas giran a aproximadamente 0,8 a 1 rpm. Actualmente se prefiere la rotación próxima a 0,9 -1,0 rpm, como se muestra en la figura.

Las botellas de cultivo rotatorias llenas y sembradas se rotan y se incuban durante aproximadamente 5 a 7 días para lograr duplicaciones máximas. Actualmente, se prefiere un tiempo de incubación de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 días.

Las botellas de cultivo rotatorias pueden estar recubiertas con un agente que ayuda a la unión de las células a la superficie interna de las botellas rotatorias, tales como gelatina, moléculas de matriz extracelular (tal como gelatina, laminina, vitronectina, fibronectina, colágeno tipos I, IV, y VI), o similares. Un ejemplo de tales botellas revestidas disponibles comercialmente son aquellas recubiertas con CellBind (disponibles en Corning como número de catálogo 3907). Se prevé que se encontrarán diversos agentes de revestimiento aceptables para la unión y el crecimiento de las células de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento.

B. Matraces de centrifugación

Los sistemas de cultivo en matraz de centrifugación son conocidos en la técnica del cultivo celular. Como se usa en el presente documento, los sistemas de cultivo en matraz de centrifugación comprenden al menos una línea celular de interés, medio de crecimiento, uno o más matraces de centrifugación, un medio para hacer girar uno o más matraces y un medio para cosechar las células.

Los sistemas de cultivo en matraz de centrifugación típicamente comprenden además medios para controlar la temperatura durante la incubación, así como medios para manipular asépticamente los cultivos, por ejemplo, durante la siembra inicial de los matraces con células, o durante las transferencias posteriores. La cosecha de las células puede lograrse mediante tratamiento enzimático, tal como con tripsina, tripsina-EDTA, dispasa y colagenasa u otras enzimas o combinaciones de enzimas con o sin otros componentes. Se pueden utilizar otros productos comerciales, tales como, pero sin limitación, TrypLE™ Express (Gibco, Inc.). Las células también se pueden cosechar mediante operaciones manuales que incluyen, por ejemplo, centrifugación discontinua, o la cosecha puede automatizarse.

En una realización, la velocidad de rotación se ajusta a entre aproximadamente 35 y aproximadamente 65 rpm, como alternativa, entre aproximadamente 35 y 45 rpm, como alternativa entre aproximadamente 40 y aproximadamente 50 rpm, como alternativa entre aproximadamente 45 rpm y aproximadamente 55 rpm, como alternativa entre aproximadamente 55 a aproximadamente 65 rpm, como alternativa de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 rpm. En realizaciones preferentes, se mantiene una velocidad de rotación de aproximadamente 40 rpm o 60 rpm.

En una realización, se usan matraces de centrifugación de 3 l que pueden llenarse con aproximadamente 3 l de medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En dicha realización, la velocidad de rotación puede establecerse entre aproximadamente 35 y 45 rpm. Preferentemente, la rotación es de

aproximadamente 40 rpm.

En otra realización, se usan matraces de 125 ml. Estos matraces pueden llenarse con aproximadamente 100 ml de una solución que comprende el medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En esa realización, los matraces contienen aproximadamente 85 ml a 115 ml de medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En dicha realización, la velocidad de rotación puede establecerse entre aproximadamente 55 y 65 rpm. Preferentemente, la rotación es de aproximadamente 50 rpm.

En aún otra realización, se usan matraces de centrifugación de 500 ml. Estos matraces pueden llenarse con aproximadamente 500 ml de una solución que comprende el medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En esa realización, los matraces contienen aproximadamente 450 ml a 500 ml de medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En dicha realización, la velocidad de rotación puede establecerse entre aproximadamente 55 y 65 rpm. Preferentemente, la rotación es de aproximadamente 50 rpm.

En una realización alternativa, se usan matraces de centrifugación de 500 ml. Estos matraces pueden llenarse con aproximadamente 500 ml de una solución que comprende el medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En esa realización, los matraces contienen aproximadamente 450 ml a 500 ml de medio de crecimiento, FBS, solución de nutrientes sin suero, microvehículos y células. En dicha realización, la velocidad de rotación puede establecerse entre aproximadamente 35 y 45 rpm. Preferentemente, la rotación es de aproximadamente 40 rpm.

Los matraces pueden sembrarse con aproximadamente 2.500 a aproximadamente 10.000 células/cm². Las células pueden sembrarse directamente en el matraz, en la superficie del matraz o en el microvehículo colocado dentro del matraz. En realizaciones preferentes, la siembra se realiza con aproximadamente 3.000 a aproximadamente 7.500, como alternativa con aproximadamente 3.000 a aproximadamente 7.000, como alternativa con aproximadamente 4.000 a aproximadamente 7.000, como alternativa con aproximadamente 3.000 a aproximadamente 5.000, como alternativa con aproximadamente 5.000 a aproximadamente 7.000, como alternativa con de aproximadamente 3.500 a aproximadamente 5.000, como alternativa de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 7.500, como alternativa de aproximadamente 3.500 a aproximadamente 5.500 células/cm². Los matraces se rotan durante la unión y el crecimiento. En una realización, para maximizar la tasa de duplicación de la población, los matraces llenos y sembrados se rotan y se incuban durante aproximadamente 5 a 7 días, prefiriéndose un tiempo de incubación de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 días.

C. Microvehículos

El cultivo de microvehículos es una técnica que hace posible el cultivo práctico de alto rendimiento de células dependientes de anclaje, por ejemplo, células posparto dependientes del anclaje. Los microvehículos se han desarrollado específicamente para el cultivo de células, tales como células posparto de mamíferos, en volúmenes de cultivo que varían desde algunos mililitros hasta más de mil litros. El microvehículo es biológicamente inerte y proporciona un sustrato fuerte pero no rígido para cultivos de microvehículos agitados. Los microvehículos pueden ser transparentes, permitiendo el examen microscópico de las células fijadas. Cytodex® 3 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway N.J.) consiste en una capa fina de colágeno desnaturalizado químicamente acoplada a una matriz de dextrano reticulado. La capa de colágeno desnaturalizado en Cytodex® 3 es susceptible a la digestión por diversas proteasas, incluidas tripsina y colagenasa, y proporciona la capacidad de eliminar células de los microvehículos mientras se mantiene la máxima viabilidad, función e integridad de las células.

Se pueden usar microvehículos libres de proteínas para cultivar las células. Por ejemplo, perlas microvehículos para su uso en la fabricación y su uso en laboratorio o investigación comercializado con el nombre comercial HILLEX® (SoloHill Engineering, Inc., Ann Arbor, MI) son perlas de poliestireno modificadas con trimetilamonio catiónico unidas a la superficie para proporcionar una superficie con carga positiva al microvehículo. El diámetro de la perla puede variar de aproximadamente 90 a aproximadamente 200 µm de diámetro.

Los procedimientos de cultivo celular basados en microvehículos proporcionan muchas ventajas, incluida la facilidad de procesamiento aguas abajo en muchas aplicaciones. Los microvehículos son típicamente de forma aproximadamente esférica y pueden ser porosos o sólidos. El uso de microvehículos para la unión de células facilita el uso de tanques agitados y reactores relacionados para el crecimiento de células dependientes de anclaje. Las células se unen a las micropartículas fácilmente suspendidas. El requisito de suspensibilidad limita los parámetros físicos de los microvehículos. Por lo tanto, los microvehículos habitualmente tienen un diámetro medio en el intermedio de 50-2000 µm. En algunas aplicaciones, los microvehículos de tipo sólido oscilan entre aproximadamente 100 y aproximadamente 250 µm, mientras que las perlas microvehículo de tipo poroso varían de aproximadamente 250 a aproximadamente 2.500 µm. Estos intervalos de tamaño permiten la selección de microvehículos, que son lo suficientemente grandes para acomodar muchas células dependientes de anclaje, mientras que son lo suficientemente pequeños como para formar suspensiones con propiedades adecuadas para su uso en reactores agitados.

Entre los factores considerados en el uso de perlas microvehículo y similares se encuentran: eficacia de unión, inmunogenicidad, biocompatibilidad, capacidad de biodegradar, tiempo para alcanzar la confluencia, los parámetros de crecimiento de las células adheridas, incluida la densidad máxima alcanzable por unidad de área de superficie, técnicas de desprendimiento cuando sea necesario y la eficiencia del desprendimiento, la escalabilidad de las condiciones de cultivo, así como la homogeneidad del cultivo en condiciones de escala, la capacidad de aumentar con éxito los procedimientos de desprendimiento y si las perlas se usarán para la implantación. Estas consideraciones pueden verse influidas por las propiedades superficiales de las perlas microvehículo, así como por las propiedades de porosidad, diámetro, densidad y manipulación del microvehículo.

Por ejemplo, la densidad de las partículas o perlas de microvehículo es una consideración. La densidad excesiva puede hacer que las partículas o perlas microvehículo sedimenten de la suspensión o tiendan a permanecer completamente hacia el fondo del recipiente de cultivo, y, por lo tanto, pueden producir una mezcla pobre de las células, medio de cultivo y fases gaseosas en el reactor. Por otro lado, una densidad demasiado baja puede provocar una flotación excesiva del microvehículo. Una densidad de 1,02 a 1,15 g/cm³ es típica de muchas perlas microvehículo.

El pequeño diámetro de las partículas microvehículo y el volumen de partículas que se pueden agregar a un reactor permite que los microvehículos contribuyan con un área superficial sustancial en gran exceso a la encontrada en las botellas de cultivo rotatoria u otros procedimientos de cultivo de células dependientes de anclaje, por ejemplo en placas. Los microvehículos porosos proporcionan un área de superficie más grande por unidad de volumen o peso. Estos microvehículos porosos poseen grandes cavidades que están disponibles para el crecimiento de células dependientes de anclaje. Estas cavidades aumentan en gran medida el área de la superficie y pueden proteger a las células de los efectos mecánicos perjudiciales, como el esfuerzo cortante, por ejemplo, por mezcla o por burbujeo de gas.

La superficie del microvehículo puede estar texturizada para mejorar la unión y la proliferación de las células. La textura de la superficie del microvehículo se puede lograr mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, moldeo, colado, lixiviación y grabado. La resolución de las características de la superficie texturizada puede ser a nanoescala. La superficie texturizada puede usarse para inducir una alineación celular específica en la superficie del microvehículo. La superficie de los poros dentro de los microvehículos porosos también se puede texturizar para mejorar la unión y la proliferación de las células. La textura de la superficie del poro se puede lograr mediante técnicas, tales como, pero no se limitan a, moldeo, colado, lixiviación y grabado.

La superficie del microvehículo puede estar recubierta con plasma para impartir una carga específica a las superficies del microvehículo. Estas cargas pueden mejorar la adhesión y la proliferación celular.

En otras realizaciones, los microvehículos comprenden, o están recubiertos con, polímeros termorreactivos por ejemplo, poli-N-isopropilacrilamida, o tiene propiedades electromecánicas. Los microvehículos también pueden poseer una microcorriente, tal como microvehículos con un par galvánico particulado de cinc y cobre que produce bajos niveles de electricidad biológicamente relevante. Los microvehículos pueden ser paramagnéticos, tales como microvehículos paramagnéticos de calcio y alginato.

Ambos tipos porosos y sólidos de vehículos de micropartículas están disponibles comercialmente. Los ejemplos de microvehículos sólidos disponibles comercialmente incluyen Cytodex® 1 y Cytodex® 3, que son microvehículos a base de dextrano de GE Healthcare Life Sciences. Los microvehículos porosos adecuados disponibles comercialmente incluyen Cytoline™ y Cytopore™ de GE Healthcare Life Sciences, Biosilon (NUNC) y Cultispher® (PerCell Biolytica).

En ciertas realizaciones, los procedimientos y kits de la invención utilizan un microvehículo de perlas de dextrano que tiene un tamaño de partícula aproximado de aproximadamente 60-90 μm y una densidad de aproximadamente 1,03 g/cm³ a 25 °C. En otras realizaciones, los procedimientos y kits de la invención utilizan un microvehículo de perlas de dextrano que tiene un tamaño de partícula aproximado de aproximadamente 114-198 μm y una densidad de aproximadamente 1,04 g/cm³ a 25 °C. En aún otra realización, los procedimientos y kits de la invención utilizan un microvehículo de perlas de dextrano que tiene un tamaño de partícula aproximado de aproximadamente 60-87 μm y una densidad de aproximadamente 1,04 g/cm³ a 25 °C. En una realización alternativa, los procedimientos y kits de la invención utilizan microvehículos porosos. Estos microvehículos porosos pueden tener un diámetro de partícula de aproximadamente 200-280 μm, un área superficial efectiva de aproximadamente 1,1 m²/g seco y una abertura promedio de diámetro de poro de aproximadamente 30 μm. En otras realizaciones, los procedimientos y kits de la invención utilizan microvehículos que tienen una superficie tratada con amina. En realizaciones preferentes, los microvehículos que tienen una superficie tratada con amina tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 160-200 μm, un intervalo de densidad relativa de aproximadamente 1.090-1.150, un área superficial de aproximadamente 515 cm²/g. Dichos microvehículos pueden proporcionarse en soluciones que contienen 5,5 x 10⁵ microvehículos/g.

Las partículas de vehículo también pueden contener un agente bioactivo. La partícula de vehículo también puede contener un agente o factor bioactivo que puede regular el crecimiento o la función de las células o el medio tisular.

Los factores adecuados incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento de fibroblastos, eritropoyetina, factores de crecimiento de células endoteliales vasculares, factores de crecimiento derivados de plaquetas, proteínas morfogénicas óseas, factores de crecimiento transformantes, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento epidérmico y factores de crecimiento similares a la insulina. Se pueden usar factores completos, miméticos o fragmentos activos de los mismos.

D. Procedimientos

Generalmente, los procedimientos de la invención comprenden cultivar (por ejemplo, expandir) células en un medio de cultivo de la invención, que se ha suplementado con suero (por ejemplo, FBS). Después de que las células hayan crecido hasta una densidad deseada (tal como, por ejemplo, durante un período de aproximadamente 3-4 días), se agrega la solución de nutrientes sin suero. Las células pueden ser células dependientes de anclaje, que pueden sembrarse en un microvehículo. El cultivo se puede llevar a cabo en una botella de cultivo rotatorio o en un sistema de cultivo en matraz de centrifugación. Preferentemente, cuando las células dependientes de anclaje se siembran en un microvehículo, se usa un sistema de cultivo de matraz de centrifugación. El período de tiempo deseado está determinado por parámetros tales como, por ejemplo, densidad de población deseada, duplicación o duplicaciones de la población deseadas o tiempo. En ciertas realizaciones, las células se cultivan durante de 4 a 7 días con el medio nutriente sin suero añadido aproximadamente al tercer día. En otras realizaciones, las células se cultivan durante 1-2 o duplicaciones de población o hasta que se alcanza una densidad de población inicial deseada antes de agregar la solución de nutrientes sin suero. Como se ha tratado anteriormente, los procedimientos permiten el crecimiento de las células (por ejemplo, hUTC) sin intercambio de medio.

1. Procedimientos de cultivo de células aisladas dependientes de anclaje

Una realización de la invención es un procedimiento para cultivar (por ejemplo, expandir) células dependientes de anclaje de acuerdo con las reivindicaciones. El procedimiento comprende cultivar células aisladas dependientes de anclaje sembradas en la superficie del matraz tisular o, preferentemente, microvehículo en un medio de cultivo, que se ha suplementado con suero, y agregar una solución de nutrientes sin suero después de que las células hayan crecido durante un período de tiempo suficiente para permitir una densidad de población inicial deseada. En una realización, las células se cultivan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 días, como alternativa entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 días, como alternativa entre aproximadamente 4 días y aproximadamente 5 días, antes de la adición de la solución de nutrientes sin suero. En una realización, las células se cultivan aproximadamente 3 días antes de la adición de la solución de nutrientes sin suero. En otra realización, las células se cultivan para permitir al menos una o dos duplicaciones de población antes de la adición a la solución de nutrientes sin suero. En una realización preferente, las células se siembran en cualquiera de los microvehículos descritos en el presente documento y se cultivan en matraces de centrifugación en las condiciones descritas anteriormente. En una realización, el procedimiento comprende descongelar un vial de banco de células que contiene estas células y la expansión de las células para inocular un recipiente de producción. Otra realización comprende la etapa de aislar primero las células y luego sembrar las células aisladas.

Como se ha tratado, el medio, incluido el medio utilizado en estos procedimientos, se puede suplementar con aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % de suero (por ejemplo, FBS). En una realización, el medio se suplementa con suero (tal como, por ejemplo, FBS) durante la preparación del medio. En otra realización, el medio se suplementa inmediatamente antes de usar (tal como, por ejemplo, mediante la adición de una solución que comprende suero (por ejemplo, FBS)). En otra realización, el medio de cultivo se suplementa preferentemente con aproximadamente 2 a 15 % (v/v) de FBS, como alternativa de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 %, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 %, como alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 %, como alternativa de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %. En las realizaciones seleccionadas, el medio de cultivo se suplementa con aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 % o aproximadamente 15 % de FBS.

En otra realización, el procedimiento también abarca sembrar las células dependientes de anclaje. Aunque la densidad de siembra objetivo puede variar, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 8.000, como alternativa de aproximadamente 5.500 a aproximadamente 7.500, como alternativa de aproximadamente 6.000 a aproximadamente 8.000, como alternativa de aproximadamente 6.500 a aproximadamente 7.500 células viables/cm² se siembran a una concentración de microvehículos de aproximadamente 12 a aproximadamente 30, como alternativa de aproximadamente 12 a 20, como alternativa de aproximadamente 18 a aproximadamente 25, como alternativa de aproximadamente 15 a aproximadamente 23 g/l.

2. Procedimientos de cultivo de células derivadas de tejido de cordón umbilical aisladas

Una realización de la invención es un procedimiento para cultivar células derivadas de cordón umbilical de acuerdo con las reivindicaciones. Si bien este procedimiento generalmente comprende las etapas del procedimiento de cultivo de células dependientes de anclaje aisladas tratadas anteriormente, puede haber algunas variaciones. De acuerdo con esto, una realización de la invención es un procedimiento de cultivo de hUTC dependiente de anclaje aislada unida a microvehículos a alta densidad celular en cultivo en suspensión en matraces de centrifugación

enriqueciendo el medio de crecimiento con una solución de nutrientes sin suero. Este procedimiento elimina de forma óptima la necesidad de intercambio de medio (por ejemplo, el día 3) para cultivar de forma consistente células > 20.000 células/cm². Además, este procedimiento mejora la solidez de los pases de hUTC. Este procedimiento utiliza los medios de cultivo y las soluciones de nutrientes sin suero.

5 El procedimiento comprende cultivar hUTC aisladas sembradas en un microvehículo en un medio de cultivo suplementado con suero (por ejemplo, FBS) durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población inicial deseada. En ciertas realizaciones, se usan las realizaciones de medio de cultivo A, B o C. En ciertas realizaciones, las células se cultivan en una botella de cultivo rotatoria y el cultivo se lleva a cabo en un sistema de botella de cultivo rotatoria. En una realización preferente, las células se siembran en microvehículos, se cultivan en matraces de centrifugación y el cultivo se lleva a cabo en el sistema de matraces de centrifugación. En una realización, las células se incuban a aproximadamente 37 °C en una atmósfera de 10 % de CO₂.

15 En otra realización, los matraces se hacen girar a una velocidad de aproximadamente 55 a aproximadamente 65 rpm, como alternativa de aproximadamente 55 rpm a aproximadamente 60 rpm, como alternativa de aproximadamente 58 rpm a aproximadamente 61 rpm. En otra realización, los matraces se hacen girar a una velocidad de aproximadamente 55 rpm a aproximadamente 45 rpm, como alternativa de aproximadamente 38 rpm a aproximadamente 42 rpm, como alternativa de aproximadamente 40 rpm a aproximadamente 43 rpm, como alternativa de aproximadamente 36 rpm a aproximadamente 45 rpm. En otra realización, la densidad de microvehículos en el medio es de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 13,0 g/l.

25 En una realización, las hUTC se cultivan a aproximadamente 37 °C en una atmósfera de 10% de CO₂ en un matraz de 125 ml, que se hace girar a un intervalo de rpm de aproximadamente 55 rpm a aproximadamente 65 rpm (preferentemente aproximadamente 60 rpm). En aún otra realización, las hUTC se cultivan a aproximadamente 37 °C en una atmósfera de 10% de CO₂ en un matraz de 500 ml, que se hace girar a un intervalo de rpm de aproximadamente 55 rpm a aproximadamente 65 rpm (preferentemente aproximadamente 60 rpm). En otra realización, las hUTC se cultivan a aproximadamente 37 °C en una atmósfera de 10% de CO₂ en un matraz de 500 ml, que se hace girar a un intervalo de rpm de aproximadamente 35 rpm a aproximadamente 45 rpm (preferentemente aproximadamente 40 rpm). En otra realización, las hUTC se cultivan a aproximadamente 37 °C en una atmósfera de 10% de CO₂ en un matraz de 3 l, que se hace girar a un intervalo de rpm de aproximadamente 35 rpm a aproximadamente 45 rpm (preferentemente aproximadamente 40 rpm). En estas realizaciones, los matraces pueden contener de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 13,0 g/l de microvehículo en el medio (preferentemente aproximadamente 12 g/l).

35 Para maximizar la densidad de duplicación de la población, los matraces o botellas de cultivo rotatorias llenos y sembrados contienen hUTC se rotan y se incuban durante al menos aproximadamente 5 a 7 días, prefiriéndose un tiempo de incubación de aproximadamente 5 a aproximadamente 6 días. Aproximadamente a mitad de la incubación (es decir, después de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 días (preferentemente 3 días)) o cuando las células han alcanzado la densidad celular inicial deseada, la solución de nutrientes sin suero se agrega al cultivo de hUTC. En ciertas realizaciones, se usan soluciones de nutrientes sin suero de las realizaciones A, B o C.

45 En una realización preferente, las células se cultivan durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población inicial deseada antes de la adición de la solución de nutrientes sin suero.

50 Por tanto, en una realización, el procedimiento comprende cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical sembradas en microvehículos en un medio de cultivo durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población inicial deseada; añadir una solución de nutrientes sin suero después de que las células hayan alcanzado la densidad de población inicial deseada; y cultivar las células durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población final deseada.

55 En otra realización, se usan la realización A del medio de cultivo y la realización de solución de nutrientes sin suero A. En otra realización, se usan la realización B del medio de cultivo y la realización de solución de nutrientes sin suero B. En una realización, se usan la realización C del medio de cultivo y la realización de solución de nutrientes sin suero C.

60 En una realización, el procedimiento comprende sembrar microvehículos con hUTC antes del cultivo. Los microvehículos pueden ser cualquiera de los microvehículos mencionados anteriormente. En ciertas realizaciones, los microvehículos tienen una superficie tratada con amina. En realizaciones preferentes, los microvehículos que tienen una superficie tratada con amina tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 160-200 μm, un intervalo de densidad relativa de aproximadamente 1.090-1.150, un área superficial de aproximadamente 515 cm²/g. En una realización, el microvehículo es Hillex® II Ultra.

65 Aunque la densidad de siembra objetivo puede variar, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 8.000, como alternativa de aproximadamente 5.500 a aproximadamente 7.500, como alternativa

- de aproximadamente 6.000 a aproximadamente 8.000, como alternativa de aproximadamente 6.500 a aproximadamente 7.500 células viables/cm² se siembran a una concentración de microvehículos de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, como alternativa de aproximadamente 18 a aproximadamente 25, como alternativa de aproximadamente 15 a aproximadamente 23 g/l. Las células sembradas se añaden a un matraz.
- 5 Como alternativa, la siembra se lleva a cabo en un matraz. En una realización, la siembra comprende descongelar hTUC crioconservadas. En una realización, el procedimiento comprende además descongelar hTUC crioconservadas y la expansión de las células antes de sembrar el microvehículo. una realización, la expansión de las células se lleva a cabo en un microvehículo.
- 10 En una realización, los medios de cultivo usados en el procedimiento para cultivar hUTC se suplementan con aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % de suero (por ejemplo, FBS). En una realización, el medio se suplementa con suero (tal como, por ejemplo, FBS) durante la preparación del medio. En otra realización, el medio se suplementa inmediatamente antes de usar (tal como, por ejemplo, mediante la adición de una solución que comprende suero (por ejemplo, FBS)). En una realización, el medio de cultivo se suplementa, preferentemente, con
- 15 aproximadamente 2 a 15 % (v/v) de FBS, como alternativa de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 %, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 %, como alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 %, como alternativa de aproximadamente 4 % a aproximadamente 10 %, como alternativa de aproximadamente 8 % a aproximadamente 15 %, como alternativa de aproximadamente 10 % a aproximadamente 15 %. En las realizaciones seleccionadas, el medio de cultivo se suplementa con aproximadamente 7,5 %,
- 20 aproximadamente 10 % o aproximadamente 15 % de FBS.

3. Otras características de los procedimientos de la invención

- 25 Las variables independientes en los procedimientos de la invención que pueden usarse para maximizar el número de duplicaciones de población alcanzables en cultivos en matraces de centrifugación o en botella de cultivo rotatorio sin necesidad de intercambio de medio son la velocidad de rotación, la densidad de siembra de las células en las botellas, la cantidad de microvehículos, el tiempo de incubación, el tipo de medio de cultivo, el tipo de solución de nutrientes sin suero y el volumen de medio colocado en la botella. El experto en la materia apreciará que otros
- 30 valores fuera de los intervalos probados podrían probarse rutinariamente usando la misma metodología y estos valores pueden ofrecer aumentos incrementales en el número de duplicaciones de la población. La respuesta máxima de la variable dependiente, aquí se mide el número de duplicaciones de población alcanzadas como una función de estos parámetros y las realizaciones no específicamente ilustradas como ejemplo en el presente documento se contemplan como parte de esta divulgación.
- 35 Las células cultivadas de acuerdo con los procedimientos proporcionados (tales como por ejemplo, hUTC) se caracterizan por tener sustancialmente el mismo perfil marcador de superficie celular o perfil de expresión génica que las células de partida. En una realización, las células cultivadas de acuerdo con los procedimientos proporcionados se caracterizan por tener sustancialmente el mismo perfil marcador de superficie celular o perfil de expresión génica que las células de partida. Para muchas aplicaciones de terapias basadas en células, es
- 40 importante que las características celulares no cambien cuando se amplían las condiciones de cultivo para aumentar las cantidades. Por ejemplo, la morfología, los marcadores de superficie celular y la expresión de genes característicos que ayudan a distinguir o denotar la célula terapéutica deben permanecer sustancialmente sin cambios si no idénticos. Las células proporcionadas de acuerdo con la invención y los procedimientos enseñados en ellas están sustancialmente sin cambios, o preferentemente idénticas en cuanto a características como las de las
- 45 mismas células cultivadas en las mismas condiciones y escalas de laboratorio.

V. Kits que comprenden el medio de cultivo y la solución de nutrientes sin suero

- 50 Otra realización de la divulgación es un kit para cultivar células, que comprende los medios de cultivo y la solución de nutrientes sin suero. En una realización, el kit comprende además las células. En una realización preferente, el kit comprende células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. El kit puede también comprender instrucciones de uso. Opcionalmente, el kit comprende además microvehículos y suero, tales como suero bovino fetal. En una realización alternativa, el kit también puede comprender un sistema de botella de cultivo rotatoria.
- 55 Sin más descripción, se cree que un experto en la materia puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, hacer y utilizar la presente invención y poner en práctica los procedimientos reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente las realizaciones preferentes de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera del resto de la divulgación.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Crecimiento y cosecha de hUTC en microvehículos en matraces de centrifugación con medios enriquecidos

- 65 En este ejemplo, se investigó el crecimiento y la cosecha de hUTC en microvehículos en matraces de centrifugación

con diversos medios enriquecidos. Para los estudios en este ejemplo, las células derivadas de tejido de cordón umbilical se expandieron a partir de un inóculo y, después, se cultivaron en diversas condiciones diferentes de crecimiento (Condiciones 1-9), cada una de las cuales empleó diferentes medios de cultivo como se describe a continuación.

5 Los microvehículos utilizados en los estudios fueron Hillex® Ultra (Solohill Engineering, Ann Arbor, MI), que tienen una superficie de 515 cm²/g.

10 Como se usa en este ejemplo, el término "pase" se define como la inoculación de un recipiente que contiene microvehículos frescos con microvehículos confluentes de un recipiente separado. Además, como se usa en este ejemplo, la expresión "duplicación de la población" se define como el número de veces que la población de células se ha duplicado en un tiempo determinado y se calcula de la siguiente manera.

15
$$\frac{\ln(n.^{\circ} \text{ de células viables al final del pase}) - \ln(n.^{\circ} \text{ de células viables al principio del pase})}{\ln(2)}$$

20 Procedimiento para el recuento de células

El recuento celular requerido por las diversas condiciones se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Se tomó asépticamente una muestra de 10 ml del cultivo y se transfirió a un tubo cónico de 15 ml. A continuación, la muestra se centrifugó a 1600 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente asegurándose de no eliminar ningún microvehículo. Después se añadieron de 5 a 10 ml de TrypLE™ Select (Gibco®) precalentado a 37 °C a los microvehículos y se agitaron en un rotador durante de 15 a 30 minutos. El contenido del tubo de centrifuga se transfirió luego a un tubo cónico de 50 ml a través de un filtro de 40 µm para eliminar los microvehículos y solo permitir el paso de las células desprendidas. Se realizaron dos lavados con 1 x PBS a través del filtro. A continuación, el tubo cónico de 50 ml se centrifugó a 1600 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente sin alterar la plataforma celular hasta que se dejaron aproximadamente 1 a 2 ml de sobrenadante en el tubo. Este volumen sobrante se midió usando una pipeta y la célula se resuspendió en este volumen. La suspensión celular resultante se contó utilizando el equipo de recuento de células CEDEX (Innovatis) que usa el procedimiento de exclusión con azul tripán. En base al recuento de células CEDEX, la concentración celular en el recipiente de cultivo se calculó de la siguiente manera:

35
$$\text{Concentración celular en el recipiente de cultivo, } \frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Volumen de resuspensión, ml} \times \text{recuento celular CEDEX, } \frac{\text{células}}{\text{ml}}}{\text{Volumen de la muestra, ml}}$$

35
$$\text{Densidad celular en el recipiente de cultivo, } \frac{\text{células}}{\text{cm}^2} = \frac{\left(\text{Concentración celular en el recipiente de cultivo, } \frac{\text{células}}{\text{ml}} \times \text{Volumen de cultivo, ml} \right)}{\left(\text{peso del microvehículo en el recipiente de cultivo, g} \times \left(\text{área de superficie por gramo de microvehículo, } \frac{\text{cm}^2}{\text{g}} \right) \right)}$$

40 Procedimiento de cultivo celular

Los viales de hUTC congelados se descongelaron y se lavaron con medio nuevo. La suspensión celular se transfirió a un matraz de centrifugación de vidrio de 125 ml que contenía el medio y el microvehículo. Estas células descongeladas se usaron para preparar el inóculo.

45 Preparación de células para el inóculo

El inóculo se expandió en múltiples pases en medio de control compuesto por DMEM y 15 % v/v de FBS con una concentración de 12 g/l de microvehículos en matraces de centrifugación de vidrio (Corning, NY) de diferentes tamaños (125 ml, 500 ml y 3 l). La duplicación acumulada de la población de las células en el inóculo fue inferior a 35. Los criterios para el pase y las condiciones de cultivo durante la expansión del inóculo se tabulan en la tabla a continuación. El día objetivo del pase, se realizó un recuento de células y, si se alcanzó la densidad objetivo para el

pase, las células se pasaron a un nuevo recipiente basándose en la densidad de siembra objetivo en el nuevo recipiente. Si no se alcanzó la densidad objetivo para el pase, se llevó a cabo un intercambio de medio del 80 % y se contaron las células el día siguiente. Para el intercambio de medio, el recipiente se apartó de la plataforma giratoria y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad durante 5 minutos y el 80 % del medio se retiró asépticamente (sin retirar los microvehículos) y se añadió una cantidad igual de medio fresco y el recipiente se colocó de nuevo en la plataforma giratoria en la incubadora.

Las condiciones de crecimiento y los parámetros durante los pases en serie para la preparación del inóculo se detallan a continuación en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1: Condiciones de crecimiento y parámetros durante los pases en serie para la preparación de inóculos.	
Densidad de siembra de nuevos recipientes de cultivo	Objetivo (intervalo)
En la descongelación, matraz de centrifugación de 125 ml (células viables/cm ²)	6000 (3000–7500)
En el pase 1, matraces de centrifugación de 500 ml (células viables/cm ²)	5000 (3000–7000)
En todos los demás pases (células viables/cm ²)	6000 (4000–7000)
Duración de los pases	Objetivo
Después de la descongelación, matraz de centrifugación de 125 ml (días)	4 (4–5)
En todos los demás pases del matraz de centrifugación de 500 ml (días)	3 (3–4)
Matraz de centrifugación de 3 l (días). Siempre 4 días con intercambio de 80 % del medio el día 3	4
Densidad celular al final del pase	Objetivo
Densidad celular al final del pase (células viables/cm ²)	≥ 20000
Volúmenes de trabajo del matraz de centrifugación	Objetivo (intervalo)
Volumen de trabajo del matraz de 125 ml (ml)	100 (85–115)
Volumen de trabajo del matraz de 500 ml (ml)	500 (450–500)
Parámetros de la incubadora	Objetivo
Temperatura (°C)	37,0
CO ₂ (%)	10
Parámetros de la placa giratoria	Objetivo (intervalo)
Agitación en matraz de 125 ml (rpm)	60 (55–65)
Agitación en matraz de 500 ml (rpm)	60 (55–65)
Agitación en matraz de 3 l (rpm)	40 (35–45)
Densidad del microvehículo	Objetivo (intervalo)
Densidad del microvehículo en medio	12 (11,0–13,0)

Diversas condiciones de crecimiento utilizadas en este ejemplo

Para cada una de las condiciones 1 a 9, el día de la inoculación se considera el Día 0. También para cada una de las condiciones, se realizó un recuento de células en el inóculo.

Condición 1 (control): La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~6.000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 18 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~9 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por DMEM y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 60 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. El día 3, se llevó a cabo un intercambio de 80 % de medio usando DMEM + 15 % de FBS. Los recuentos celulares periódicos se realizaron usando el procedimiento descrito anteriormente. El día 3 y 5, se añadieron 3 ml y 2,5 ml de glucosa al matraz, respectivamente. El tercer día se añadieron 2,5 ml de L-glutamina 200 mM.

Condición 2: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~6.000 células viables/cm² a una concentración

de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M5 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 60 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F5. No se realizó intercambio de medio. Además, al tercer día, se añadieron 2,5 ml de glucosa. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. El día 5, se añadieron al matraz 5 ml de L-glutamina 200 mM.

Condición 3: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M1 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F1. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa. Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

Condición 4: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M2 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F2. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 4,5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

Condición 5: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M3 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F3. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

Condición 6: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M4 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F4. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

Condición 7: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M5 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F5. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml

de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

5 Condición 8: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M6 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F6. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

15 Condición 9: La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~7000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M7 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 45 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F7. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día se añadieron 2,5 ml de glucosa (solución acuosa de 220 g/l de dextrosa monohidrato). Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

Cosecha

30 Al sexto día se cosecharon todos los matraces. Para la cosecha, los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad y el medio se eliminó lo más posible sin eliminar ningún microvehículo. Se añadieron 250 - 300 ml de TrypLE™ precalentado a 37 °C al matraz y se colocaron en una plataforma giratoria en la incubadora a 37 °C. Después de 30 minutos, se detuvo la agitación y se tomó una muestra de 25 ml del matraz y se filtró a través de un filtro de 40 µm. El microvehículo retenido en el filtro se descartó y se realizó un recuento de células en la muestra ejecutando directamente la muestra en el CEDEX. En base al volumen de TrypLE™ agregado y el conteo de células obtenidas, se calcularon las células totales en el recipiente y se calculó la densidad celular (células/cm²).

Composición de los medios de cultivo celular

40 DMEM (con 1 g/l de glucosa, L-Glutamina 4mM y 3,7 g/l de bicarbonato de sodio y sin piruvato de sodio y rojo fenol) fue el medio basal usado para la Condición 1 (el control).

También se probaron Varios otros medios basales para identificar algunos componentes, que son fundamentales para eliminar el intercambio de medio y, por lo tanto, reducen el consumo de suero. Uno de los componentes usados en las formulaciones es seroalbúmina bovina, que se proporcionó en forma de AlbuMAX® I disponible en el mercado (Gibco™ Cell Culture, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), que es seroalbúmina bovina rica en lípidos. La Tabla 1-2 proporciona la formulación de los medios basales (M1-M7). Tanto el medio basal como el medio de alimentación contenían el estabilizador de membranas celulares comercialmente disponible y el agente antiespumante Pluronic® F68.

50

Tabla 1–2 Formulación de medios basales

	Medio basal						
	M1 (g/l)	M2 (g/l)	M3 (g/l)	M4 (g/l)	*5 (g/l)	M6 (g/l)	M7 (g/l)
Sales inorgánicas							
Cloruro de calcio anhidro	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 667 573 T3

Cloruro de potasio, USP	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Sulfato de magnesio anhidro	0,9767	0,9767	0,9767	0,9767	0,9767	0,9767	0,9767
Cloruro de sodio, USP	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
fosfato de sodio, monobásico, H ₂ O, USP	0,133175	0,125	0,133175	0,133175	0,133175	0,125	0,125
fosfato de sodio, heptahidrato dibásico (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	0,00201	0	0,00201	0,00201	0,00201	0	0
Oligoelementos							
Nitrato férrico (9 H ₂ O)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Pentahidrato de sulfato de cobre (II) (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	9,33 E-08	0	9,33 E-08	9,33 E-08	9,33 E-08	0	0
Sulfato de cinc, heptahidrato, (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	3,24 E-05	0	3,24 E-05	3,24 E-05	3,24 E-05	0	0
Selenato de Sodio (Na ₂ SeO ₃)	0,000067	0,000067	0	0,000067	0,000067	0,000067	0
Aminoácidos							
L-Arginina, HCl	0,09705	0,084	0,09705	0,09705	0,09705	0,084	0,084
L-Cistina, 2HCl	0,06779	0,06257	0,06779	0,06779	0,06779	0,06257	0,06257
L-Cisteína HCl H ₂ O	0,009224	0	0,009224	0,009224	0,009224	0	0
L-glutamina	0,584	0,584	0,584	0,584	0,584	0,584	0,584
Glicina	0,031125	0,03	0,031125	0,031125	0,031125	0,03	0,03
L-Histidina, HCl, H ₂ O	0,048288	0,042	0,048288	0,048288	0,048288	0,042	0,042
L-iso-leucina	0,163713	0,1048	0,163713	0,163713	0,163713	0,1048	0,1048
L-leucina	0,163713	0,1048	0,163713	0,163713	0,163713	0,1048	0,1048
L-Lisina, HCl	0,16807	0,1462	0,16807	0,16807	0,16807	0,1462	0,1462
L-metionina	0,036748	0,03	0,036748	0,036748	0,036748	0,03	0,03
L-fenilalanina	0,073695	0,066	0,073695	0,073695	0,073695	0,066	0,066
L-serina	0,05145	0,042	0,05145	0,05145	0,05145	0,042	0,042
L-treonina	0,108609	0,0952	0,108609	0,108609	0,108609	0,0952	0,0952
L-triptófano	0,018457	0,016	0,018457	0,018457	0,018457	0,016	0,016
L-tirosina, 2Na, 2H ₂ O	0,121813	0,10379	0,121813	0,121813	0,121813	0,10379	0,10379
L-valina	0,111105	0,0936	0,111105	0,111105	0,111105	0,0936	0,0936
L-Alanina	0,000668	0	0,000668	0,000668	0,000668	0	0
L-Aspargina H ₂ O	0,031978	0	0,031978	0,031978	0,031978	0	0
L-Ácido aspártico	0,00803	0	0,00803	0,00803	0,00803	0	0
L-Ácido glutámico	0,054728	0	0,054728	0,054728	0,054728	0	0
L-prolina	0,02403	0	0,02403	0,02403	0,02403	0	0
L-Taurina	0,000844	0	0,000844	0,000844	0,000844	0	0

Vitaminas							
Pantotenato D-Calcio	0,004338	0,004	0,004338	0,004338	0,004338	0,004	0,004
Cloruro de colina	0,006094	0,004	0,006094	0,006094	0,006094	0,004	0,004
Ácido fólico	0,004302	0,004	0,004302	0,004302	0,004302	0,004	0,004
l-Inositol	0,009568	0,007	0,009568	0,009568	0,009568	0,007	0,007
Niacinamida	0,004302	0,004	0,004302	0,004302	0,004302	0,004	0,004
Piridoxal, HCl	0,004153	0,004	0,004153	0,004153	0,004153	0,004	0,004
Riboflavina	0,000431	0,0004	0,000431	0,000431	0,000431	0,0004	0,0004
tiamina•HCl	0,004304	0,004	0,004304	0,004304	0,004304	0,004	0,004
d-Biotina	3,75 E-05	0	3,75 E-05	3,75 E-05	3,75 E-05	0	0
Piridoxina. HCl	1,85 E-05	0	1,85 E-05	1,85 E-05	1,85 E-05	0	0
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	0,000102	0	0,000102	0,000102	0,000102	0	0
Lípidos							
Ácido lipoico/Ácido tióctico	0,000015	0	0,000015	0,000015	0,000015	0	0
Etanolamina HCl	0,02	0,02	0	0,02	0,02	0,02	0
Proteínas							
Insulina	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0
Transferrina	0,055	0,055	0	0,055	0,055	0,055	0
Sustratos de energía							
D-glucosa	1	1	1	1	1	1	1
Piruvato sódico	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Derivados de ácido nucleico							
timidina	0,00045	0,00045	0,00045	0	0,00045	0	0
Adenosina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Citidina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Uridina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Guanosina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Otros							
Putrescina.2H ₂ O	3,02 E-05	0	3,02 E-05	3,02 E-05	3,02 E-05	0	0
Pluronic® F68	0,015	0	0,015	0,015	0,015	0	0
Seroalbúmina bovina (AlbuMAX® I)	2,5	2,5	2,5	2,5	0	2,5	2,5

5 Como se ha indicado anteriormente, el día 3, se realizó un intercambio del 80 % del medio en la condición 1. Para las condiciones restantes, se agregó una alimentación para eliminar el intercambio de medio. Las diferentes formulaciones de alimentación se muestran en la Tabla 1-3. Las cantidades que se muestran en la Tabla 1-3 presentan el aumento en peso (g) del componente por litro (l) del volumen de cultivo cuando se agrega la alimentación.

Tabla 1-3: Formulaciones de la alimentación

	Formulaciones de la alimentación						
	F1 (g/l)	F2 (g/l)	F3 (g/l)	F4 (g/l)	F5 (g/l)	F6 (g/l)	F7 (g/l)
Sales inorgánicas							
fosfato de sodio, monobásico, H ₂ O, USP	0,008175	0	0,008175	0,008175	0,008175	0	0

ES 2 667 573 T3

	Formulaciones de la alimentación						
	F1 (g/l)	F2 (g/l)	F3 (g/l)	F4 (g/l)	F5 (g/l)	F6 (g/l)	F7 (g/l)
fosfato de sodio, heptahidrato dibásico (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	0,00201	0	0,00201	0,00201	0,00201	0	0
Oligoelementos							
Pentahidrato de sulfato de cobre (II) (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	9,33 E-08	0	9,33 E-08	9,33 E-08	9,33 E-08	0	0
Sulfato de cinc, heptahidrato, (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	3,24 E-05	0	3,24 E-05	3,24 E-05	3,24 E-05	0	0
Selenato de Sodio (Na ₂ SeO ₃)	0,000067	0,000067	0	0,000067	0,000067	0,000067	0
Aminoácidos							
L-Arginina, HCl	0,01305	0	0,01305	0,01305	0,01305	0	0
L-Cistina, 2HCl	0,00522	0	0,00522	0,00522	0,00522	0	0
L-Cisteína HCl H ₂ O	0,009224	0	0,009224	0,009224	0,009224	0	0
Glicina	0,001125	0	0,001125	0,001125	0,001125	0	0
L-Histidina, HCl, H ₂ O	0,006288	0	0,006288	0,006288	0,006288	0	0
L-iso-leucina	0,058913	0	0,058913	0,058913	0,058913	0	0
L-leucina	0,058913	0	0,058913	0,058913	0,058913	0	0
L-Lisina, HCl	0,02187	0	0,02187	0,02187	0,02187	0	0
L-metionina	0,006748	0	0,006748	0,006748	0,006748	0	0
L-fenilalanina	0,007695	0	0,007695	0,007695	0,007695	0	0
L-serina	0,00945	0	0,00945	0,00945	0,00945	0	0
L-treonina	0,013409	0	0,013409	0,013409	0,013409	0	0
L-triptófano	0,002457	0	0,002457	0,002457	0,002457	0	0
L-tirosina, 2Na, 2H ₂ O	0,018023	0	0,018023	0,018023	0,018023	0	0
L-valina	0,017505	0	0,017505	0,017505	0,017505	0	0
L-Alanina	0,000668	0	0,000668	0,000668	0,000668	0	0
L-Aspargina H ₂ O	0,031978	0	0,031978	0,031978	0,031978	0	0
L-Ácido aspártico	0,00803	0	0,00803	0,00803	0,00803	0	0
L-Ácido glutámico	0,054728	0	0,054728	0,054728	0,054728	0	0
L-prolina	0,02403	0	0,02403	0,02403	0,02403	0	0
L-Taurina	0,000844	0	0,000844	0,000844	0,000844	0	0

	Formulaciones de la alimentación						
	F1 (g/l)	F2 (g/l)	F3 (g/l)	F4 (g/l)	F5 (g/l)	F6 (g/l)	F7 (g/l)
Vitaminas							
Pantotenato D-Calcio	0,000338	0	0,000338	0,000338	0,000338	0	0
Cloruro de colina	0,002094	0	0,002094	0,002094	0,002094	0	0
Ácido fólico	0,000302	0	0,000302	0,000302	0,000302	0	0
l-Inositol	0,002568	0	0,002568	0,002568	0,002568	0	0
Niacinamida	0,000302	0	0,000302	0,000302	0,000302	0	0
Piridoxal, HCl	0,000153	0	0,000153	0,000153	0,000153	0	0
Riboflavina	3,11 E-05	0	3,11 E-05	3,11 E-05	3,11 E-05	0	0
tiamina•HCl	0,000304	0	0,000304	0,000304	0,000304	0	0
d-Biotina	3,75 E-05	0	3,75 E-05	3,75 E-05	3,75 E-05	0	0
Piridoxina. HCl	1,85 E-05	0	1,85 E-05	1,85 E-05	1,85 E-05	0	0
Vitamina B ₁₂ (cianocobalamina)	0,000102	0	0,000102	0,000102	0,000102	0	0
Lípidos							
Ácido lipoico/Ácido tióctico	0,000015	0	0,000015	0,000015	0,000015	0	0
Etanolamina HCl	0,02	0,02	0	0,02	0,02	0,02	0,02
Proteínas							
Insulina	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01
Transferrina	0,055	0,055	0	0,055	0,055	0,055	0,055
Derivados de ácido nucleico							
timidina	0,00045	0,00045	0,00045	0	0,00045	0	0
Adenosina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Citidina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Uridina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Guanosina	0,015	0,015	0,015	0	0,015	0	0
Otros							
Putrescina.2H ₂ O	3,02 E-05	0	3,02 E-05	3,02 E-05	3,02 E-05	0	0
Pluronic® F68	0,015	0	0,015	0,015	0,015	0	0
Seroalbúmina bovina (AlbuMAX®I)	2,5	2,5	2,5	2,5	0	2,5	2,5

Los medios utilizados en las Condiciones 1 a 9 tenían todos FBS agregado a ellos. Los componentes de FBS se muestran a continuación:

5 **Tabla 1-4: Perfil de suero de bovino fetal (véase Price y col., In Vitro, 18:576-584 (1982))**

Descripción	Promedio	Intervalo	N
Endotoxina	0,356 ng/ml	0,008-10,0	39
pH	7,4*	7,20-7,60	40

Descripción	Promedio	Intervalo	N
Sales inorgánicas			
Calcio (Ca ²⁺)	13,6/100 ml	12,6–14,3	43
Cloruro (Cl ⁻)	103 meq/l	98–108	43
Fósforo inorgánico	9,8 mg/100 ml	4,3–11,4	43
Potasio (K ⁺)	11,2 meq/l	10,0–14,0	43
Selenio	0,026 µg/ml	0,014–0,038	25
Sodio (Na ⁺)	137 meq/l	125–143	43
Otros componentes			
Fosfatasa alcalina	255 mU/ml	111–352	43
Nitrógeno ureico en sangre	16 mg/100 ml	14–20	43
Creatina	3,1 mg/100 ml	1,6–4,3	43
Bilirrubina directa	0,2 mg/100 ml	0,0–0,5	43
Glucosa	125 mg/100 ml	85–247	43
Hemoglobina	11,3 mg/100 ml	2,4–18,1	17
Lactato deshidrogenasa	864 mU/ml	260–1.215	43
Glutamato sérico Oxalacetato Transaminasa	130 mU/ml	20–201	43
Bilirrubina total	0,4 mg/100 ml	0,3–1,1	43
Ácido úrico	2,9 mg/100 ml	1,3–4,1	43
Esteroides y hormonas			
Colesterol	31 mg/100 ml	12–63	43
Cortisol	0,5 µg/ml	<0,1–2,3	43
Hormona estimulante del folículo	9,5 ng/ml	<2–33,8	34
Hormona de crecimiento	39,0 ng/ml	18,7–51,6	40
Hormona luteinizante	0,79 ng/ml	0,12–1,8	38
Hormona paratiroidea	1.718 pg/ml	85–6.180	41
Progesterona	8 ng/100 ml	<0,3–36	42
Prolactina	17,6 ng/ml	2,00–49,55	40
Prostaglandina E	5,91 ng/ml	0,5–30,48	37
Prostaglandina F	12,33 ng/ml	3,77–42,00	38
T3	119 ng/100 ml	56–233	41
T4	12,1 ng/100 ml	7,8–15,6	42
Testosterona	40 ng/100 ml	21–99	42
Hormona estimulante del tiroides	1,22 ng/ml	<0,2–4,5	40
Proteína			
Proteína total	3,8g/100 ml	3,2–7,0	43
Albúmina	2,3 g/100 ml	2,0–3,6	43
Insulina	10 mU/ml	6–14	40

Resultados

5 Los recuentos celulares de las diferentes condiciones se muestran en la Tabla 1-5 a continuación.. Los resultados se pueden analizar en dos partes. Al comparar las Condiciones 1 y 2, es evidente que la combinación de medio M5 y alimentación F5 el día 3 elimina el intercambio de medio. Esto es importante, ya que esto reducirá drásticamente la concentración sérica en más del 44 %. Al comparar las condiciones 3 a 9, es evidente que las siguientes tres condiciones tienen el rendimiento más bajo en comparación con otras. Condición 6, medio basal M4 + 15 % de SFB con alimentación F4 el día 3; Condición 8, medio basal M6 + 15 % de SFB con alimentación F6 el día 3; y Condición

9, medio basal M7 + 15 % de FBS con alimentación de F7 el día 3. Una mirada más cercana a las formulaciones indica que ninguna de estas tres condiciones tiene derivados de ácido nucleico en los medios o la alimentación. Por lo tanto, también se puede inferir que los derivados de ácido nucleico son críticos para el crecimiento de hUTC. Este ejemplo demuestra que hUTC puede cultivarse durante 6 días sin intercambio de medio enriqueciendo el medio de cultivo y suplementando componentes de medio adicionales el día 3 y los derivados de ácido nucleico son críticos para mantener un crecimiento celular comparable.

Tabla 1-5: Recuentos de células viables, células/cm² para cultivos de hUTC cultivados en las condiciones 1-9

Día	Condición								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	5690	6061	7030	7030	7030	7030	7030	7030	7030
3	11942	–	28747	32633	21431	21810	19506	21320	25037
4	–	20035	31976	38891	25825	21256	20134	17146	17569
5	32035	34329	40470	49787	46249	32827	36203	26921	27699
6	49757	53418	69408	71271	64602	38443	65313	38982	39718
Condición 1: DMEM + 15 % de FBS e intercambio de 80 % de medio el día 3									
Condición 2: M5 + 15 % de FBS y adición de F5 el día 3									
Condición 3: M1 + 15 % de FBS y adición de F1 el día 3									
Condición 4: M2 + 15 % de FBS y adición de F2 el día 3									
Condición 5: M3 + 15 % de FBS y adición de F3 el día 3									
Condición 6: M4 + 15 % de FBS y adición de F4 el día 3									
Condición 7: M5 + 15 % de FBS y adición de F5 el día 3									
Condición 8: M6 + 15 % de FBS y adición de F6 el día 3									
Condición 9: M7 + 15 % de FBS y adición de F7 el día 3									

Ejemplo 2

Crecimiento y pases en serie de hUTC en microvehículo en matraces de centrifugación con medios enriquecidos

Los pases en serie de células de tejido umbilical humano (hUTC) unidas a microvehículos en cultivo en suspensión en matraces de centrifugación requieren un intercambio de medio si las células no alcanzan una densidad celular óptima predeterminada de > 20.000 células/cm² el día 3. Este intercambio de medio agrega manipulaciones adicionales al procedimiento y hace que sea difícil predecir el programa de pases de células. Por lo tanto, este procedimiento para pasar células no es comercialmente deseable. Las hUTC pueden cultivarse hasta una alta densidad celular mediante el intercambio de un medio de crecimiento celular que contiene un 15 % de suero bovino fetal. Este ejemplo investigó un procedimiento alternativo más comercialmente deseable para pasar hUTC. Las hUTC unidas en un microvehículo se cultivaron a una alta densidad celular en cultivo en suspensión en matraces de centrifugación enriqueciendo el medio de crecimiento con nutrientes sin suero. Este procedimiento elimina el intercambio de medio el día 3 para cultivar de forma consistente las células > 20.000 células/cm². Este procedimiento mejora la solidez del procedimiento para el pase de etc.

En este estudio se usó lo siguiente: DMEM (con 2 g/l de glucosa, L-glutamina 4mM y 3,7 g/l de bicarbonato sódico y sin piruvato sódico y rojo fenol); suero bovino fetal (15 % v/v); medio basal M5 (véase el Ejemplo 1 anterior); alimentación F5 (véase el Ejemplo 1 anterior); y se usaron microvehículos Hillex® Ultra (Solohill Engineering, Ann Arbor, MI).

Procedimiento de análisis de marcadores en la superficie

Se usó 3 % de FBS en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin Ca ni Mg como tampón de tinción. Se usaron seis anticuerpos para identificar los marcadores de superficie y se usaron dos anticuerpos como controles. La lista de anticuerpos y sus diluciones en tampón de tinción para el ensayo se muestran en la Tabla 2-1 a continuación.

Tabla 2-1 Lista de anticuerpos y diluciones

Anticuerpo	Fabricante	N.º de catálogo	Concentración del fabricante	Dilución en tampón de tinción	Comentarios
IgG1	BD Biosciences	555749	1 µg/20 µl	1:10	Control par CD13, CD90, HLA-ABC, CD34
				1:2	Control para CD117
IgG2	BD Biosciences	555574	1 µg/20 µl	1:8	Control para HLA-DR
CD 13	BD Biosciences	555394	2 µg/20 µl	1:20	
CD34	BD Biosciences	555822	0,06 µg/20 µl	ninguno	
CD90	BD Biosciences	555596	1 µg/20 µl	1:10	
CD117	BD Biosciences	340529	10 µg/ml	ninguno	
HLA-ABC	BD Biosciences	555553	0,03 µg/20 µl	ninguno	
HLA-DR	BD Biosciences	555812	0,125 µg/20 µl	ninguno	

- Metodología: Se realizó un recuento de células en la muestra y se resuspendieron $2,5 \times 10^6$ células en 10 ml de medio DMEM + 15 % de FBS. A continuación, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en tampón de tinción para obtener una concentración celular de 1×10^6 células/ml. Esta suspensión celular se distribuyó después en tubos diferentes, de manera que cada tubo recibe 20.000 células. Luego se agregaron cantidades apropiadas de anticuerpo diluido y tampón de tinción como se muestra en la Tabla 2-1 anterior. A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 2-8 °C. Después de la incubación, se añadieron 3 ml de DPBS y las muestras se centrifugaron. El sobrenadante se eliminó y la plataforma celular se volvió a suspender en 500 µl de DPBS. A continuación, se pasaron las muestras en el instrumento Guava® PCA™, Millipore, MD, EE. UU. De los seis marcadores de superficie, tres son marcadores positivos (CD 13, CD90, HLA-ABC) y tres son marcadores negativos (CD34, CD117, HLA-DR).

Condiciones del cultivo

- Los procedimientos de cultivo y los pases en serie de las hUTC se explicaron en el Ejemplo 1. Como se ha mencionado, este pase en serie utilizó DMEM con 15 % de FBS como medio de cultivo y con frecuencia requirió intercambio del medio para cumplir el criterio de pase. En este ejemplo, se intentó eliminar la necesidad de un intercambio de medios recuente durante los pases en serie. Esto se logró utilizando medio M5 modificado (con 2 g/l de glucosa en lugar de 1 g/l) y 15 % de FBS (v/v). Con el uso de este medio M5 modificado con 15 % de SFB, se fijó el día del pase y no se realizó intercambio de medio en seis pases. Las condiciones de cultivo y los criterios se presentan en la Tabla 2-2 que se expone a continuación.

Tabla 2-2: Condiciones del cultivo

Densidad de siembra de nuevos recipientes de cultivo	Objetivo (intervalo)
En la descongelación; matraz de centrifugación de 125 ml (células viables/cm ²)	6000 (3000-7500)
En el pase 1: matraz de centrifugación de 125 ml a 500 ml (células viables/cm ²)	5000 (3200-7000)
En todos los demás pases: matraces de centrifugación de 500 ml (células viables/cm ²)	7000 (6000-8000)
Duración de los pases	Objetivo
Tras descongelar: matraz de centrifugación de 125 ml (días).	4
En todos los demás pases: matraz de centrifugación de 500 ml (días)	3

Parámetros del matraz de centrifugación	Objetivo (intervalo)
Volumen de trabajo del matraz de 125 ml (ml)	100 (85–115)
Volumen de trabajo del matraz de 500 ml (ml)	500 (450–500)
Parámetros de la incubadora	Objetivo
Temperatura (°C)	37,0
CO ₂ (%)	10
Parámetros de la placa giratoria	Objetivo (intervalo)
Agitación en matraz de 125 ml (rpm)	60 (55–65)
Agitación en matraz de 500 ml (rpm)	40 (35–45)
Densidad del microvehículo	Objetivo (intervalo)
Densidad del microvehículo en medio	12 (11,0–13,0)

Las células tuvieron un crecimiento robusto en seis pases, como se muestra en la Tabla 2-3 a continuación. En un procedimiento con solo DMEM + 15 % de FBS, las células con frecuencia requerían un intercambio de medio el día anterior al pase para lograr una duplicación de la población de 1,5, extendiendo así la duración del pase un día adicional. Con el medio enriquecido, las células tenían al menos más de 1,5 duplicaciones de población consistentemente en un plazo de 3 días (4 días desde la descongelación del vial) y no requerían ningún intercambio de medio. Las células conservaron su identidad después de siete pases en este medio y luego cultivaron estas células durante 6 días en este medio con alimentación F5 el día 3 del cultivo de 6 días. El análisis de los marcadores de superficie de estas células se muestra en la Tabla 2-4 a continuación.

Tabla 2-3: Resultados

N.º de pase	N.º de día	Densidad de células viables células/cm ²	Duplicaciones de población dentro del pase
0 (Después de la descongelación del vial)	4	31890	2,5
1	3	34311	2,5
2	3	40464	2,5
3	3	19398	1,5
4	3	30816	2,2
5	3	22100	1,7
6	3	35607	2,3

Tabla 2-4: Resultados de marcadores de superficie de células pasadas en medio M5 + 15 % de SFB durante 7 pases, seguido de 6 días de cultivo en medio M5 + 15 % de FBS y alimentación F5 el día 3 del cultivo de 6 días

ID del marcador de superficie	Resultado
CD13	(+)
CD90	(+)
HLA ABC	(+)
CD34	(-)
CD117	(-)
HLA DR	(-)

Ejemplo 3

Crecimiento de hUTC en microvehículos en un medio con niveles reducidos de suero en matraces de centrifugación

5 Las células de tejido umbilical humano (hUTC) se pueden cultivar a una alta densidad celular mediante el intercambio de medio de crecimiento celular que contiene 15 % de FBS el día 3 de la carrera. La alta concentración sérica en el medio y el intercambio de medio no es deseable desde el punto de vista comercial debido al alto coste del suero, el uso elevado de suero para la producción y las manipulaciones operacionales adicionales. Este ejemplo desvela un procedimiento para cultivar hUTC unidas a microvehículos en medio de crecimiento con niveles reducidos de suero y sin intercambio de medio mientras se logra una alta densidad celular.

10 El medio de cultivo utilizado en el ejemplo fue el medio basal M5 (véase anteriormente), con 2 g/l de D-glucosa en lugar de 1 g/l de D-Glucosa, a la cual se añadió suero bovino fetal. Se utilizó el medio de alimentación F5.. Se proporcionó glucosa como una solución acuosa de 220 g/l de monohidrato de dextrosa. Se proporcionó glutamina como una solución 200 mM. En este ejemplo, se estudiaron diferentes condiciones de crecimiento. Estas condiciones se detallan a continuación. Tal como se usa en estas condiciones, el día de la inoculación se considera Día 0. Además, se usaron microvehículos de Hilllex® Ultra (Solohill Engineering, Ann Arbor, MI) en cada condición.

15 **Condición 1 (15 % de FBS):** Se realizó un recuento de células en el inóculo. La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~6.000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M5 y 15 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 60 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F5. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día y al quinto día se añadieron 2,5 ml de glucosa. Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

20 **Condición 2 (10 % de FBS):** Se realizó un recuento de células en el inóculo. La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~6.000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M5 y 10 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 60 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F5. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día y al quinto día se añadieron 2,5 ml de glucosa. Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

25 **Condición 3 (7,5 % de FBS):** Se realizó un recuento de células en el inóculo. La densidad de siembra objetivo de esta condición fue ~6.000 células viables/cm² a una concentración de microvehículo de ~ 20 g/l. Según el recuento de células de los inóculos, se añadió el volumen de inóculo deseado a un nuevo matraz de centrifugación de vidrio de 500 ml tratado en autoclave. Los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El medio del inóculo se eliminó hasta que quedaban ~ 100 ml en el matraz. A continuación, se agregaron microvehículos frescos, que dieron como resultado un peso final de ~10 g de microvehículos en el matraz. Se añadió medio fresco compuesto por medio basal M5 y 7,5 % (v/v) de FBS para aumentar el volumen a 500 ml. El matraz se colocó en una plataforma giratoria a 60 RPM en una incubadora a 37 °C y 10 % de CO₂. Al tercer día, se agregó la alimentación F5. No se realizó intercambio de medio. Los recuentos de células periódicas se realizaron como se explica en la sección de recuento celular. Al tercer día y al quinto día se añadieron 2,5 ml de glucosa. Al cuarto día, se añadieron 5 ml de L-Glutamina 200 mM al matraz.

30 **Cosecha:** Al sexto día se cosecharon ambos matraces. Para la cosecha, los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad y el medio se eliminó lo más posible sin eliminar ningún microvehículo. Se añadieron 300 ml de TrypLE™ precalentado a 37 °C al matraz y se colocaron en una plataforma giratoria en la incubadora a 37 °C. Después de 30 minutos, se detuvo la agitación y se tomó una muestra de 25 ml del matraz y se filtró a través de un filtro de 40 µm. El microvehículo retenido en el filtro se descartó y se realizó un recuento de células en la muestra ejecutando directamente la muestra en el CEDEX. En base al volumen de TrypLE™ agregado y el conteo de células obtenidas, se calcularon las células totales en el recipiente y se calculó la densidad celular (células/cm²).

35 **Resultados:** Los recuentos de células de las tres condiciones con diferente concentración de FBS en cada uno se muestran en la Tabla a continuación. Además de los resultados de este ejemplo, se incluyen los resultados del Ejemplo 1, Condición 1 (DMEM + 15 % FBS con Intercambio medio el Día 3) para comparación. Por lo tanto, los medios enriquecidos no solo eliminan el intercambio de los medios sino que también pueden reducir la

concentración de suero en el medio, minimizando de ese modo la cantidad de suero utilizada en cultivo.

Tabla 3-1 Recuentos de células, células viables/cm²

Día	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Control
0	5652	5652	5652	5690
4	30839	25182	26802	–
5	42358	34827	28889	32035
6	58252	59841	54369	49757
Condición 1: M5 + 15 % de FBS y F5 el día 3				
Condición 2: M5 + 10 % de FBS y F5 el día 3				
Condición 3: M5 + 7,5 % de FBS y F5 el día 3				
Control: 15 % de FBS con intercambio medio el día 3 (Datos mostrados en el Ejemplo 1 anterior)				

5

Ejemplo 4

Aislamiento de células

10 **Aislamiento de células umbilicales.** Los cordones umbilicales se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se obtuvieron después de administraciones normales. Los protocolos de aislamiento celular se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar. Para eliminar sangre y residuos, el cordón se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 mg/ml y anfotericina B a 0,25 µg/ml (Invitrogen Carlsbad, CA). Los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo tisular de 150 cm² en presencia de 50 ml de medio (DMEM-bajo en glucosa o DMEM-rico en glucosa; Invitrogen) hasta que el tejido se molió en una pulpa fina. Los tejidos cortados se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml (aproximadamente 5 g de tejido por tubo).

15

20 El tejido se digirió luego en medio DMEM-bajo en glucosa o en medio DMEM-rico en glucosa, cada uno conteniendo penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 mg/ml, anfotericina B a 0,25 µg/ml y las enzimas de digestión. En algunos experimentos, se usó una mezcla enzimática de colagenasa y dispasa ("C:D") (colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 500 U/ml y dispasa (Invitrogen), 50 U/ml, en medio DMEM-bajo en glucosa). En otros experimentos, se utilizó una mezcla de colagenasa, dispasa e hialuronidasa ("C: D: H") (C: D: H = colagenasa, 500 U/ml; dispasa, 50 U/ml; e hialuronidasa (Sigma), 5 U/ml, en DMEM-glucosa baja). Los tubos cónicos que contienen el tejido, el medio y las enzimas de digestión se incubaron a 37 °C en un agitador orbital (Environ, Brooklyn, NY) a 225 rpm durante 2 horas.

20

25

30 Después de la digestión, los tejidos se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se aspiró. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento (DMEM: bajo en glucosa (Invitrogen), 15 % de suero bovino fetal (v/v) (FBS, suero bovino fetal definido, lote N° AND18475, Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 µg/ml y anfotericina B a 0,25 µg/ml (cada una de Invitrogen, Carlsbad, CA)). La suspensión celular se filtró a través de un filtro de células BD FALCON de nylon de 70 µm (BD Biosciences, San Jose, CA). Se pasó un aclarado adicional de 5 ml que comprendía medio de crecimiento a través del filtro. A continuación, se pasó la suspensión celular a través de un filtro de células de nailon de 40 µm (BD Biosciences, San Jose, CA) y se persiguió con un aclarado de 5 ml adicionales de medio de crecimiento.

30

35

40 El filtrado se resuspendió en medio de crecimiento (volumen total 50 ml) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 ml de medio de crecimiento fresco. Este procedimiento se repitió dos veces más.

40

45 Después de la centrifugación final, se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de medio de crecimiento fresco. El número de células viables se determinó usando tinción con azul tripán. Las células se cultivaron a continuación en condiciones estándar.

45

50 Las células aisladas de los tejidos del cordón umbilical se sembraron a 5.000 células/cm² sobre matraces T-75 recubiertos de gelatina (Corning Inc., Corning, NY) en medio de crecimiento. Después de dos días, se aspiraron células gastadas y no adherentes de los matraces. Las células adherentes se lavaron con PBS tres veces para eliminar los restos y las células derivadas de la sangre. Después, las células se rellenaron con medio de crecimiento y se dejaron crecer hasta la confluencia (aproximadamente 10 días desde el paso 0 al paso 1). En pases posteriores (del pase 1 al 2, etc.), las células alcanzaron una subfluencia (75-85 % de confluencia) en 4-5 días. Para estos pases posteriores, las células se sembraron a 5.000 células/cm². Las células se cultivaron en una incubadora

50

humidificada con 5 % de dióxido de carbono a 37 °C.

En algunos experimentos, las células se aislaron de tejidos posparto en medio DMEM bajo en glucosa después de la digestión con LIBERASE (2,5 mg/ml, Blendzyme 3; Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN) y hialuronidasa (5 U/ml, Sigma). La digestión del tejido y el aislamiento de las células fue como se describió para otras digestiones de proteasas anteriores, sin embargo, se usó la mezcla de LIBERASA/hialuronidasa en lugar de la mezcla de enzimas C: D o C: D: H. La digestión tisular con LIBERASE dio como resultado el aislamiento de las poblaciones celulares de los tejidos posparto que se expandieron fácilmente.

Se compararon los procedimientos para aislar las células del cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas. Las enzimas comparadas para la digestión incluyeron: i) colagenasa; ii) dispasa; iii) hialuronidasa; iv) colagenasa : Mezcla de dispasa (C: D); v) mezcla de colagenasa: hialuronidasa (C: H); vi) mezcla de dispasa:hialuronidasa (D: H); y vii) mezcla de colagenasa: dispasa: hialuronidasa (C: D: H). Se observaron diferencias en el aislamiento celular que utilizan estas diferentes condiciones de digestión de enzimas (véase la Tabla 4-1).

Se hicieron otros intentos para aislar grupos de células del cordón umbilical por diferentes enfoques. un caso, se cortó el cordón umbilical y se lavó con medio de crecimiento para desalojar los coágulos de sangre y el material gelatinoso. La mezcla de sangre, material gelatinoso y medio de crecimiento se recogió y se centrifugó a 150 x g. El sedimento se resuspendió y se sembró en matraces recubiertos de gelatina en medio de crecimiento.. A partir de estos experimentos, se aisló una población celular que se expandió fácilmente.

Las células también se han aislado a partir de muestras de sangre de cordón obtenidas de NDRI. El protocolo de aislamiento utilizado fue el de solicitud de patente internacional PCT/US2002/029971 de Ho y col., Las muestras (50 ml y 10,5 ml, respectivamente) de sangre de cordón umbilical (NDRI, Philadelphia PA) se mezclaron con tampón de lisis (cloruro de amonio 155 mM esterilizado por filtro, bicarbonato de potasio 10 milimolar, EDTA 0,1 mM tamponado a pH 7,2 (todos los componentes de Sigma, St. Louis, MO)). Las células se lisaron en una proporción de 1:20 de sangre de cordón a tampón de lisis. La suspensión celular resultante se sometió a agitación vorticial durante 5 segundos, y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó (10 minutos a 200 x g). El sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo completo (Gibco, Carlsbad CA) que contiene 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan UT), glutamina 4 mM (Mediatech Herndon, VA), penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml (Gibco, Carlsbad, CA). Las células resuspendidas se centrifugaron (10 minutos a 200 x g), se aspiró el sobrenadante y el sedimento celular se lavó en medio completo. Las células se sembraron directamente en matraces T75 (Corning, NY), matraces recubiertos con laminina T75 o matraces revestidos con fibronectina T175 (ambos Becton Dickinson, Bedford, MA).

Para determinar si las poblaciones celulares podían aislarse en diferentes condiciones y expandirse bajo una variedad de condiciones inmediatamente después del aislamiento, las células se digirieron en medio de crecimiento con o sin 0.001% (v/v) de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, MO), utilizando la combinación de enzimas C: D: H, de acuerdo con los procedimientos proporcionados anteriormente. Todas las células se cultivaron en presencia de penicilina a 100 U/ml y estreptomycin a 100 µg/ml. En todas las condiciones probadas, las células se unieron y se expandieron bien entre el paso 0 y 1 (Tabla 4-2). Se demostró que las células en las condiciones 5-8 y 13-16 proliferan bien hasta 4 pases después de la siembra, momento en el que se crioconservaron.

La combinación de C: D: H proporcionó el mejor rendimiento celular después del aislamiento y generó células que se expandieron durante muchas más generaciones en cultivo que las otras condiciones (Tabla 4-1). No se logró una población de células expansible usando colagenasa o hialuronidasa sola. No se intentó determinar si este resultado es específico de la colagenasa que se probó.

Tabla 4-1: Aislamiento de células de tejido de cordón umbilical usando diferentes combinaciones de enzimas

Digerido enzimático	Células aisladas	Expansión celular
Colagenasa	X	X
Dispasa	+ (> 10 h)	+
Hialuronidasa	X	X
Colagenasa:Dispasa	++ (< 3 h)	++
Colagenasa:Hialuronidasa	++ (< 3 h)	+
Dispasa:Hialuronidasa	+ (> 10 h)	+
Colagenasa:Dispasa:Hialuronidasa	+++ (< 3 h)	+++

Clave: + = bueno, ++ = muy bueno, +++ = excelente, X = sin éxito

5 Las células se unieron y se expandieron bien entre el pase 0 y 1 bajo todas las condiciones probadas para la digestión enzimática y el crecimiento (Tabla 4-2). Las células en condiciones experimentales 5-8 y 13-16 proliferaron bien hasta cuatro pasadas después de la siembra, momento en el que se crioconservaron. Todas las células se crioconservaron para un análisis posterior.

Tabla 4-2: Aislamiento y expansión del cultivo de células posparto en condiciones variables

Condición	Medio	15 % FBS	BME	Gelatina	20 % O ₂	Factores de crecimiento
1	DMEM-Lg	Y	Y	Y	Y	N
2	DMEM-Lg	Y	Y	Y	N (5 %)	N
3	DMEM-Lg	Y	Y	N	Y	N
4	DMEM-Lg	Y	Y	N	N (5 %)	N
5	DMEM-Lg	N (2 %)	Y	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
6	DMEM-Lg	N (2 %)	Y	N (Laminina)	N (5 %)	EGF/FGF (20 ng/ml)
7	DMEM-Lg	N (2 %)	Y	N (Fibronectina)	Y	PDGFNEGF
8	DMEM-Lg	N (2 %)	Y	N (Fibronectina)	N (5 %)	PDGFNEGF
9	DMEM-Lg	Y	N	Y	Y	N
10	DMEM-Lg	Y	N	Y	N (5 %)	N
11	DMEM-Lg	Y	N	N	Y	N
12	DMEM-Lg	Y	N	N	N (5 %)	N
13	DMEM-Lg	N (2 %)	N	N (Laminina)	Y	EGF/FGF (20 ng/ml)
14	DMEM-Lg	N (2 %)	N	N (Laminina)	N (5 %)	EGF/FGF (20 ng/ml)
15	DMEM-Lg	N (2 %)	N	N (Fibronectina)	Y	PDGF/VEGF
16	DMEM-Lg	N (2 %)	N	N (Fibronectina)	N (5 %)	PDGFNEGF

10 Las células nucleadas se unieron y crecieron rápidamente. Estas células se analizaron mediante citometría de flujo y fueron similares a las células obtenidas por digestión enzimática.

15 Las preparaciones contenían glóbulos rojos y plaquetas. No se unieron células nucleadas y se dividieron durante las primeras 3 semanas. El medio se cambió 3 semanas después de la siembra y no se observó que las células se unieran y crecieran.

20 Las poblaciones de células podrían aislarse del tejido umbilical de manera eficiente utilizando la enzima combinación colagenasa (una metaloproteasa), dispasa (proteasa neutra) y hialuronidasa (enzima mucolítica que descompone el ácido hialurónico). También se puede usar LIBERASE, que es una mezcla de colagenasa y una proteasa neutra. Blendzyme 3, que es colagenasa (4 Wunsch U/g) y termolisina (1714 caseína U/g), también se utilizó junto con hialuronidasa para aislar las células. Estas células se expandieron fácilmente a lo largo de muchos pases cuando se cultivaron en medio de expansión de crecimiento sobre plástico recubierto de gelatina.

25 Las células también se aislaron de la sangre residual en las cuerdas, pero no de la sangre del cordón umbilical. La presencia de células en los coágulos sanguíneos lavados del tejido, que se adhieren y crecen en las condiciones utilizadas, puede deberse a que las células se liberaron durante el procedimiento de disección.

Ejemplo 5

30 **Análisis de cariotipo de células**

35 Las líneas celulares usadas en terapia celular son preferentemente homogéneas y están libres de cualquier tipo de célula contaminante. Las células humanas utilizadas en la terapia celular deben tener un número normal (46) de cromosomas con estructura normal. Para identificar líneas celulares derivadas del ombligo que son homogéneas y libres de células de origen no umbilical, se analizaron cariotipos de muestras celulares.

UTC del tejido posparto de un recién nacido varón se cultivó en medio de crecimiento. El tejido posparto de un neonato masculino (X, Y) se seleccionó para permitir la distinción entre las células derivadas de neonatos y las células derivadas de la madre (X, X). Las células se sembraron a 5.000 células por centímetro cuadrado en medio de crecimiento en un matraz T25 (Corning, Corning, NY) y se expandieron a 80% de confluencia. Un matraz T25 que contenía células se llenó al cuello con medio de crecimiento. Las muestras se entregaron a un laboratorio de citogenética clínica por servicio de mensajería (el tiempo estimado de laboratorio a laboratorio es de una hora). El análisis de cromosomas fue realizado por el Centro de Genética Humana y Molecular en la New Jersey Medical School, Newark, NJ. Las células se analizaron durante la metafase cuando los cromosomas se visualizan mejor. De veinte células en metafase contadas, cinco se analizaron para el número de cariotipo homogéneo normal (dos). Una muestra de células se caracterizó como homogénea si se observaron dos cariotipos. Una muestra de células se caracterizó como heterogénea si se observaron más de dos cariotipos. Se contaron y analizaron células en metafase adicionales cuando se identificó un número de cariotipo heterogéneo (cuatro).

El personal de laboratorio de citogenética interpretó que todas las muestras de células enviadas para el análisis de cromosomas mostraban una apariencia normal. Tres de las dieciséis líneas celulares analizadas mostraron un fenotipo heterogéneo (XX y XY) que indica la presencia de células derivadas tanto del origen neonatal como materno (Tabla 5-1). Cada una de las muestras de células se caracterizó como homogénea. (Tabla 5-1).

Tabla 5-1: Resultados de cariotipo de hUTC

Tejido	N.º de pase	Células en metafase contadas	Células en metafase analizadas	Número de cariotipos	Cariotipo ISCN
Umbilical	23	20	5	2	46, XX
Umbilical	6	20	5	2	46, XY
Umbilical	3	20	5	2	46, XX

El análisis cromosómico identificó el UTC derivado del ombligo cuyos cariotipos parecen normales tal como lo interpreta un laboratorio clínico citogenético. El análisis del cariotipo también identificó líneas celulares libres de células maternas, según lo determinado por cariotipo homogéneo.

Ejemplo 6

Evaluación por citometría de flujo de marcadores de superficie celular

La caracterización de las proteínas de la superficie celular o "marcadores" mediante citometría de flujo puede usarse para determinar la identidad de una línea celular. La consistencia de la expresión puede determinarse a partir de múltiples donantes y en células expuestas a diferentes procedimientos y condiciones de cultivo. Las líneas celulares posparto aisladas del ombligo se caracterizaron por citometría de flujo, proporcionando un perfil para la identificación de estas líneas celulares.

Las células se cultivaron en medio de crecimiento, en matraces de cultivo de tejidos T75, T150 y T225 tratados con plasma (Corning, Corning, NY) hasta confluir. Las superficies de crecimiento de los matraces se recubrieron con gelatina incubando gelatina al 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Las células adherentes en los matraces se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (Gibco, Carlsbad, MO) y separado con tripsina/EDTA (Gibco). Las células se recogieron, se centrifugaron y se resuspendieron en FBS al 3% (v/v) en PBS a una concentración celular de 1x10.⁷/ ml De acuerdo con las especificaciones del fabricante, se añadió anticuerpo al marcador de superficie celular de interés (véase a continuación) a 100 µl de suspensión celular y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para eliminar el anticuerpo no unido. Las células se resuspendieron en 500 µl de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento de calibración FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se usaron los siguientes anticuerpos para marcadores de superficie celular.

Tabla 6-1: Anticuerpos utilizados en la caracterización de marcadores de superficie celular de UDC.

Anticuerpo	Fabricante	Número de catálogo
CD10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375

CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-alfa	BD Pharmingen	556002
HLA-A, B, C	BD Pharmingen	555553
HLA-DR, DP, DQ	BD Pharmingen	555558
IgG-FITC	Sigma (St. Louis, MO)	F-6522
IgG- PE	Sigma	P-4685

Las células derivadas umbilicales se analizaron en los pases 8, 15 y 20.

5 Para comparar las diferencias entre los donantes, las células derivadas de tejido de cordón umbilical de diferentes donantes se compararon entre sí. Las células derivadas umbilicales cultivadas en matraces recubiertos de gelatina también se compararon con células derivadas de ombligo cultivadas en matraces no revestidos.

10 Se compararon cuatro tratamientos utilizados para el aislamiento y la preparación de células. Células derivadas de tejido posparto por tratamiento con: 1) colagenasa; 2) colagenasa/dispasa; 3) colagenasa/hialuronidasa; y 4) colagenasa/hialuronidasa/dispasa se compararon.

15 Las células derivadas del cordón umbilical en el pase 8, 15 y 20 analizadas mediante citometría de flujo expresaron todos CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, indicados por un aumento de la fluorescencia en relación con la IgG control. Estas células fueron negativas para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, indicadas por valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

20 Las células derivadas del cordón umbilical aisladas de donantes separados analizados por citometría de flujo mostraron positivamente la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, reflejados en el aumento de los valores de fluorescencia relativo al control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

25 Las células derivadas del cordón umbilical expandidas sobre matraces recubiertos de gelatina y sin recubrimiento analizadas mediante citometría de flujo fueron todas positivas para la producción de CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C, con aumento valores de fluorescencia en relación con el control de IgG. Estas células fueron negativas para la producción de CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ, con valores de fluorescencia consistentes con el control de IgG.

30 El análisis de las células derivadas del cordón umbilical mediante citometría de flujo ha establecido una identidad de estas líneas celulares. Estas células derivadas del cordón umbilical son positivas para CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-alfa y HLA-A, B, C; y negativo para CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 y HLA-DR, DP, DQ. Esta identidad fue consistente entre las variaciones en variables que incluyen el donante, el pase, el revestimiento de la superficie del recipiente de cultivo, las enzimas de digestión y la capa placentaria. Se observaron algunas variaciones en la curva del histograma de valores de fluorescencia individuales y se observaron rangos, pero todas las curvas positivas en todas las condiciones probadas fueron normales y expresaron valores de fluorescencia mayores que el control de IgG, confirmando así que las células comprenden una población homogénea, que tiene expresión positiva del marcador.

40 Ejemplo 7

40 Análisis de células por matriz de oligonucleótidos

45 Se usaron matrices de oligonucleótidos para comparar los perfiles de expresión génica de células derivadas de placenta y derivadas umbilicales con fibroblastos, células madre mesenquimatosas humanas y otra línea celular derivada de médula ósea humana. Este análisis proporcionó una caracterización de las células derivadas del

posparto e identificó marcadores moleculares únicos para estas células.

Células derivadas de tejido posparto. Los cordones umbilicales humanos y la placenta se obtuvieron del National Disease Research Interchange (NDRI, Filadelfia, PA) a partir de partos normales a término completo con el consentimiento del paciente. Los tejidos se recibieron y las células se aislaron como se describe en el Ejemplo 5 después de la digestión con una mezcla C: D: H. Las células se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces de cultivo de tejidos de plástico recubiertos de gelatina. Los cultivos se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂.

Fibroblastos. Los fibroblastos dérmicos humanos se adquirieron en Cambrex Incorporated (Walkersville, MD, número de lote 9F0844) y ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Ambas líneas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 10% (v/v) (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen)). Las células se cultivaron en plástico estándar tratado con tejido.

Células madre mesenquimatosas humanas (hMSC). Las hMSC se adquirieron en Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; lotes números 2F1655, 2F1656 y 2F1657) y se cultivaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante en MSCGM Media (Cambrex). Las células se cultivaron en plástico cultivado de tejido estándar a 37 °C con 5% de CO₂.

Células de médula ósea de la cresta iliaca humana (ICBM). La médula ósea de cresta iliaca humana se recibió de NDRI con el consentimiento del paciente. La médula se procesó de acuerdo con el procedimiento descrito por Ho, y col., (WO03/025149) La médula se mezcló con tampón de lisis (NH 155 mM)₄Cl, 10 mM KHCO₃ y EDTA 0,1 mM, pH 7,2) en una proporción de 1 parte de médula ósea a 20 partes de tampón de lisis. La suspensión celular se agitó en vórtice, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en Medio Mínimo Esencial-alfa (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y glutamina 4 mM. Las células se centrifugaron nuevamente y el sedimento celular se resuspendió en medio nuevo. Las células mononucleares viables se contaron usando exclusión con azul tripán (Sigma, St. Louis, MO). Las células mononucleares se sembraron en matraces de cultivo de tejidos de plástico a 5 x 10⁴ células/cm². Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ ya sea en O atmosférico estándar₂ o al 5% O₂. Las células se cultivaron durante 5 días sin un cambio de medio. Los medios y las células no adherentes se eliminaron después de 5 días de cultivo. Las células adherentes se mantuvieron en cultivo.

Cultivos de células en crecimiento activo se eliminaron de los matraces con un raspador celular en solución salina tamponada con fosfato fría (PBS). Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en PBS reciente y se centrifugaron nuevamente. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. El ARNm celular se extrajo y se transcribió en ADNc. El ADNc se transcribió luego en ARNc y se marcó con biotina. El ARNc marcado con biotina se hibridó con matrices de oligonucleótidos Affymetrix GENECHIP HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA). Las hibridaciones y la recopilación de datos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El análisis de los datos se realizó utilizando el software informático "Significance Analysis of Microarrays" (SAM) versión 1.21 (Tusher, V.G. y col., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 5116-5121) Las licencias para el software de análisis están disponibles a través de la Oficina de Licencias Tecnológicas de la Universidad de Stanford, y hay más información disponible en la World Wide Web en el sitio web del Profesor Tibshirani en el Depto. De Estadísticas de la Universidad de Stanford.

Catorce poblaciones diferentes de células se analizaron en este estudio. Las células, junto con la información del paso, el sustrato de cultivo y los medios de cultivo se enumeran en la Tabla 7-1. Las líneas celulares se enumeran por su código de identificación junto con el pase en el momento del análisis, el sustrato de crecimiento celular y los medios de crecimiento.

Tabla 7-1: Células analizadas por el estudio de micromatrices.

Población celular	N.º de pase	Sustrato	Medio
Umbilical (022803)	2	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
Umbilical (042103)	3	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
Umbilical (071003)	4	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
Placenta (042203)	12	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
Placenta (042903)	4	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
Placenta (071003)	3	Gelatina	DMEM, 15 % FBS, 2–BME
ICBM (070203) (5 % O ₂)	3	Plástico	MEM 10 % FBS
ICBM (062703) (std. O ₂)	5	Plástico	MEM 10 % FBS
ICBM (062703) (5 % O ₂)	5	Plástico	MEM 10 % FBS

hMSC (Lote 2F1655)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1656)	3	Plástico	MSCGM
hMSC (Lote 2F1657)	3	Plástico	MSCGM
hFibroblasto (9F0844)	9	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS
hFibroblasto (CCD39SK)	4	Plástico	DMEM-F12, 10 % FBS

Los datos se evaluaron mediante análisis de componentes principales con el software SAM como se describió anteriormente. El análisis reveló 290 genes que se expresaron en diferentes cantidades relativas en las células probadas. Este análisis proporcionó comparaciones relativas entre las poblaciones.

5

La Tabla 7-2 muestra las distancias euclidianas que se calcularon para la comparación de los pares de células. Las distancias euclidianas se basaron en la comparación de las células basadas en los 290 genes que se expresaron diferencialmente entre los tipos de células. La distancia euclidiana es inversamente proporcional a la similitud entre la expresión de los 290 genes. La distancia euclidiana se calculó para los tipos de células usando estos 290 genes expresados diferencialmente entre los tipos de células. La similitud entre las células es inversamente proporcional a la distancia euclidiana.

10

Tabla 7-2. Las distancias euclidianas para los pares celulares.

<i>Par de células</i>	<i>Distancia euclidiana</i>
ICBM-hMSC	24,71
Placenta-umbilical	25,52
ICBM-Fibroblasto	36,44
ICBM-placenta	37,09
Fibroblasto-MS	39,63
ICBM-Umbilical	40,15
Fibroblasto-Umbilical	41,59
MS-Placenta	42,84
MS-Umbilical	46,86
ICBM-placenta	48,41

15

Las tablas 7-3, 7-4 y 7-5 muestran la expresión de genes aumentados en células derivadas de placenta (Tabla 7-3), aumentadas en células derivadas de cordón umbilical (Tabla 7-4) y reducidas en cordón umbilical y células derivadas de placenta (Tabla 7-5).

20

Tabla 7-3: Genes que aumentan específicamente la expresión en las células derivadas de la placenta en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de acceso en NCBI
209732_a	Lectina de tipo C (dominio de reconocimiento de hidratos de carbono dependiente de calcio), superfamilia, miembro 2 (inducida por activación)	AF070642
206067_s_a	Tumor de Wilms 1	NM_024426
207016_s_a	familia aldehído deshidrogenasa 1, miembro A2	AB015228
206367_a	Renina	NM_000537
210004_a	receptor de lipoproteína de baja densidad oxidada (tipo lectina) 1	AF035776
214993_a	<i>Homo sapiens</i> , clon IMAGEN: 4179671, ARNm, CD parcial	AF070642
202178_a	proteína quinasa C, zeta	NM_002744
209780_a	proteína hipotética DKFZp564F013	AL136883
204135_a	regulado negativamente en el cáncer de ovario 1	NM_014890
213542_a	<i>Homo sapiens</i> ARNm; ADNc DKFZp547K1113 (del clon DKFZp547K1113)	AI246730

Tabla 7-4. Los genes que aumentan específicamente su expresión en células derivadas del cordón umbilical en comparación con las otras líneas celulares analizadas.

ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	Número de acceso en NCBI
202859_x_a	Interleucina	NM_000584
211506_s_a	Interleucina 8	AF043337
210222_s_a	reticulón 1	BC000314
204470_a	ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 1 (actividad estimulante del crecimiento del melanoma)	NM_001511
206336_a	ligando quimioquina (motivo C-X-C) 6 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2)	NM_002993
207850_a	Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 3	NM_002090
203485_a	reticulón 1	NM_021136
202644_s_a	factor de necrosis tumoral, proteína alfa 3	NM_006290

5 **Tabla 7-5: Genes que disminuyeron su expresión en el cordón umbilical y las células placentarias en comparación con las otras líneas celulares analizadas.**

ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	N.º de acceso en NCBI
210135_s_a	estatura corta homeobox 2	AF022654,1
205824_a	proteína 2 del choque térmico 27kDa	NM_001541,1
209687_a	ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor 1 derivado de células estromales)	U19495,1
203666_a	ligando de quimioquina (motivo C-X-C) 12 (factor 1 derivado de células estromales)	NM_000609,1
212670_a	elastina (estenosis aórtica supravulvar, síndrome de Williams-Beuren)	AA479278
213381_a	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp586M2022 (del clon DKFZp586M2022)	N91149
206201_s_a	homeobox 2 del mesénquima (homeobox específico de detención del crecimiento)	NM_005924,1
205817_a	Homólogo 1 de homeobox Sine oculis homeobox (<i>Drosophila</i>)	NM_005982,1
209283_a	cristalina, alfa B	AF007162,1
212793_a	activador asociado disheveled de la morfogénesis 2	BF513244
213488_a	Proteína DKFZP586B2420	AL050143,1
209763_a	similar a la neuralina 1	AL049176
205200_a	Tetranectina (proteína de unión al plasminógeno)	NM_003278,1
205743_a	Árbol de homología src (SH3) y dominio rico en cisteína	NM_003149,1
200921_s_a	Gen 1 de translocación de células B, antiproliferativo	NM_001731,1
206932_a	colesterol 25-hidroxilasa	NM_003956,1
204198_s_a	factor de transcripción relacionado con runt 3	AA541630
219747_a	proteína hipotética FLJ23191	NM_024574,1
204773_a	Receptor de interleucina 11, alfa	NM_004512,1
202465_a	Potenciador de la procolágeno C-endopeptidasa	NM_002593,2
203706_s_a	Homólogo de Frizzled 7 (<i>Drosophila</i>)	NM_003507,1
212736_a	gen hipotético BC008967	BE299456
214587_a	Colágeno, tipo VIII, alfa 1	BE877796
201645_a	Tenascina C (hexabrachion)	NM_002160,1
210239_a	proteína 5 iroquois homeobox	U90304,1

ID del conjunto de sondas	Nombre del gen	N.º de acceso en NCBI
203903_s_a	Hefesto	NM_014799,1
205816_a	integrina, beta 8	NM_002214,1
203069_a	glicoproteína sináptica vesícula 2	NM_014849,1
213909_a	ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12280 fis, clon MAMMA1001744	AU147799
206315_a	factor 1 similar al receptor de citoquina	NM_004750,1
204401_a	canal de potasio intermedio/conductancia pequeña activado por calcio, subfamilia N, miembro 4	NM_002250,1
216331_a	integrina, alfa 7	AK022548,1
209663_s_a	integrina, alfa 7	AF072132,1
213125_a	Proteína DKFZP586L151	AW007573
202133_a	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
206511_s_a	Homólogo 2 de homeobox de <i>Sine oculis (Drosophila)</i>	NM_016932,1
213435_a	Proteína KIAA1034	AB028957,1
206115_a	respuesta de crecimiento temprano 3	NM_004430,1
213707_s_a	Homeobox distal-less 5	NM_005221,3
218181_s_a	proteína hipotética FLJ20373	NM_017792,1
209160_a	familia aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (3-alfa hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)	AB018580,1
213905_x_a	Biglicano	AA845258
201261_x_a	Biglicano	BC002416,1
202132_a	coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ)	AA081084
214701_s_a	fibronectina 1	AJ276395,1
213791_a	Proencedalina	NM_006211,1
205422_s_a	Integrina, de tipo beta 1 (con dominios de repetición similares a EGF)	NM_004791,1
214927_a	ARNm de <i>Homo sapiens</i> de inserción completa clon de ADNc EUROIMAGE	AL359052,1
	1968422	
206070_s_a	EphA3	AF213459,1
212805_a	Proteína KIAA0367	AB002365,1
219789_a	Receptor del péptido natriurético C/guanilato ciclasa C (receptor péptido atrionatriurético C)	AI628360
219054_a	proteína hipotética FLJ14054	NM_024563,1
213429_a	ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp564B222 (del clon DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_a	proteína de membrana asociada a vesículas 5 (miobrevina)	NM_006634,1
201843_s_a	Proteína de matriz extracelular similar a fibulina que contiene EGF 1	NM_004105,2
221478_a	BCL2/adenovirus E1B 19kDa proteína de interacción de tipo 3	AL132665,1
201792_a	AE proteína de unión 1	NM_001129,2
204570_a	subunidad VIIa del polipéptido 1 de la citocromo c oxidasa (músculo)	NM_001864,1
201621_a	neuroblastoma, supresión de tumorigenicidad 1	NM_005380,1
202718_a	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, 36 kDa	NM_000597,1

Las tablas 7-6, 7-7 y 7-8 muestran la expresión de genes aumentados en fibroblastos humanos (Tabla 7-6), células ICBM (Tabla 7-7) y MSC (Tabla 7-8).

5 **Tabla 7-6: Genes que se incrementaron en expresión en fibroblastos en comparación con las otras líneas celulares analizadas**

Fosfatasa 2 de especificidad doble
Proteína KIAA0922
ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23224 fis, clon ADSU02206
dineína, polipéptido intermedio 1, citoplasmático
ankirina 3, nodo de Ranvier (ankirina G)
inhibina, beta A (activina A, activina AB polipéptido alfa)
Ectonucleótido pirofosfatasa / fosfodiesterasa 4 (función putativa)
Proteína KIAA1053
Proteína 1A asociada a los microtúbulos
Proteína 41 del dedo de cinc
Proteína HSPC019
ADNc de <i>Homo sapiens</i> : FLJ23564 fis, clon LNG10773
ARNm de <i>Homo sapiens</i> ; ADNc DKFZp434M0435 (del clon DKFZp564A072)
Proteína LIM (similar al enigma de unión a la proteína quinasa C de rata)
Inhibidor del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en células B, proteína asociada al complejo quinasa
Proteína hipotética FLJ22004
Secuencia de ARNm humano (clon CTG-A4)
EST, moderadamente similares al factor 2 similar al receptor de citocinas; precursor del receptor CRL2 de citocinas [<i>Homo sapiens</i>]
Factor transformante de crecimiento, beta 2
Proteína hipotética MGC29643
Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal MRC OX-2
Posible proteína de retinopatía ligada a X

Tabla 7-7: Genes que se incrementaron en expresión en células derivadas de ICBM en comparación con las otras líneas celulares analizadas

5

• proteína repetitiva de anquirina cardíaca
• Región ORF del MHC de clase I
• Integrina alfa10
• Proteína hipotética FLJ22362
• UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N - acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc - T3)
• proteína 44 inducida por interferón
• SRY (región determinante del sexo Y) -box 9 (displasia campomelic, reversión sexual autosómica)
• proteína 1-1 asociada a la queratina
• similar a la hipocalcina 1
• dentada 1 (síndrome de Alagille)
• Proteoglicano 1, gránulo secretor

Tabla 7-8: Genes que se incrementaron en expresión en células MSC en comparación con las otras líneas celulares analizadas

• Interleucina 26
• maltasa-glucoamilasa (α -glucosidasa)
• subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
• homólogo de oncogén viral del osteosarcoma murino v-fos FBJ

• proteína hipotética DC42
• subfamilia del receptor nuclear 4, grupo A, miembro 2
• homólogo de oncogén B de osteosarcoma murino FBJ
• WNT1 proteína de vía de señalización inducible 1
• Secuencia transformante derivada de la línea celular MCF.2
• canal de potasio, subfamilia K, miembro 15
• homeoproteína de clase emparejada de cartílago 1
• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ12232 fis, clon MAMMA1001206
• ADNc de <i>Homo sapiens</i> FLJ34668 fis, clon LIVER2000775
• protooncogén jun B
• LLC de células B/linfoma 6 (proteína en dedo de cinc 51)
• proteína en dedo de cinc 36, tipo C3H, homólogo (ratón)

5 Este ejemplo se realizó para proporcionar una caracterización molecular de las células derivadas del cordón umbilical y la placenta. Este análisis incluyó células derivadas de tres cordones umbilicales diferentes y tres placentas diferentes. El estudio también incluyó dos líneas diferentes de fibroblastos dérmicos, tres líneas de células madre mesenquimatosas y tres líneas de células de médula ósea de cresta iliaca. El ARNm que se expresó por estas células se analizó en un conjunto de oligonucleótidos GENECHIP que contenía sondas de oligonucleótidos para 22,000 genes.

10 El análisis reveló que las transcripciones de 290 genes estaban presentes en diferentes cantidades en estos cinco tipos de células diferentes. Estos genes incluyen diez genes que aumentan específicamente en las células derivadas de la placenta y siete genes específicamente aumentados en las células derivadas del cordón umbilical. Se encontró que cincuenta y cuatro genes tenían niveles de expresión específicamente más bajos en células derivadas de tejido de cordón umbilical y derivadas de placenta.

15 Ejemplo 8

Caracterización inmunohistoquímica de los fenotipos celulares

20 Los fenotipos de las células encontradas dentro del tejido del cordón umbilical humano se analizaron mediante inmunohistoquímica.

25 El tejido del cordón umbilical humano se recogió y la inmersión se fijó en paraformaldehído al 4% (p/v) durante la noche a 4 °C. La inmunohistoquímica se realizó usando anticuerpos dirigidos contra los siguientes epítomos (véase la Tabla 8-1): vimentina (1: 500; Sigma, St. Louis, MO), desmina (1: 150, contra conejo; Sigma; o 1: 300, contra ratón; Chemicon, Temecula, CA), alfa -actina de músculo liso (SMA; 1: 400; Sigma), citoqueratina 18 (CK18; 1: 400; Sigma), factor de von Willebrand (vWF; 1: 200; Sigma) y CD34 (humano CD34 clase III; 1: 100 ; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Además, se probaron los siguientes marcadores: GROalfa-PE antihumano (1: 100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), GCP-2 antihumano (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), receptor de LDL oxidado antihumano 1 (ox-LDL R1; 1: 100; Santa Cruz Biotech) y anti-NOGO-A humano (1: 100; Santa Cruz Biotech). Las muestras fijas se cortaron con un bisturí y se colocaron dentro del compuesto de inclusión OCT (Tissue-Tek OCT, Sakura, Torrance, CA) en un baño de hielo seco que contenía etanol. A continuación, los bloques congelados se seccionaron (10 µm de espesor) usando un criostato estándar (Leica Microsystems) y se montaron en portaobjetos de vidrio para tinción.

35 La inmunohistoquímica se realizó de forma similar a estudios previos. (por ejemplo, Messina y col., Exper. Neurol., 2003; 184: 816-829) Las secciones tisulares se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se expusieron a una solución de bloqueo de proteínas que contenía PBS, suero de cabra al 4% (v/v) (Chemicon, Temecula, CA) y Tritón al 0,3% (v/v) (Triton X-100; Sigma) durante 1 hora para acceder a los antígenos intracelulares. En los casos en que el epítomo de interés estaría ubicado en la superficie de la célula (CD34, ox-LDL R1), se omitió el tritón en todas las etapas del procedimiento para evitar la pérdida de epítomos. Además, en los casos en que el anticuerpo primario se generó contra cabra (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), se utilizó suero de burro al 3% (v/v) en lugar de suero de cabra durante todo el procedimiento. Los anticuerpos primarios, diluidos en solución de bloqueo, se aplicaron entonces a las secciones durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. Se eliminaron las soluciones de anticuerpos primarios, y los cultivos se lavaron con PBS antes de la aplicación de soluciones secundarias de anticuerpos (1 hora a temperatura ambiente) que contenían bloque junto con IgG de cabra anti-ratón Texas Red (1: 250; Molecular Probes, Eugene, OR) y/o IgG de cabra anti-conejo Alexa 488 (1: 250; Sondas moleculares) o IgG-FITC de cabra anti-cabra (1: 150; Santa Cruz Biotech). Los cultivos se lavaron, y se aplicaron 10 micromolar DAPI (Molecular Probes) durante 10 minutos para visualizar los núcleos celulares.

50 Después de la inmunotinción, se visualizó la fluorescencia usando el filtro de fluorescencia apropiado en un microscopio epifluorescente invertido Olympus (Olympus, Melville, NY). La tinción positiva se representó mediante

señal de fluorescencia por encima de la tinción de control. Las imágenes representativas se capturaron utilizando una cámara de video digital en color y el software ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). Para muestras teñidas por triplicado, cada imagen fue tomada usando solo un filtro de emisión a la vez. Los montajes en capas se prepararon con el software Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

5

Tabla 8-1: Resumen de los anticuerpos principales utilizados

Anticuerpo	Concentración	Proveedor
Vimentina	1:500	Sigma, St. Louis, MO
Desmina (rb)	1:150	Sigma
Desmina (m)	1:300	Chemicon, Temecula, CA
alfa-actina de músculo liso (SMA)	1:400	Sigma
Citoqueratina 18 (CK18)	1:400	Sigma
factor von Willebrand (vWF)	1:200	Sigma
CD34 III	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA
GROalfa-PE	1:100	BD, Franklin Lakes, NJ
GCP-2	1:100	Santa Cruz Biotech
Ox-LDL R1	1:100	Santa Cruz Biotech
NOGO-A	1:100	Santa Cruz Biotech

- 10 Los marcadores de vimentina, desmina, SMA, CK18, vWF y CD34 se expresaron en un subconjunto de las células encontradas dentro del cordón umbilical (datos no mostrados). En particular, la expresión de vWF y CD34 estaba restringida a los vasos sanguíneos contenidos dentro de la médula. Las células CD34 + estaban en la capa más interna (lado del lumen). La expresión de vimentina se encontró en toda la matriz y los vasos sanguíneos del cordón. La AME se limitó a la matriz y las paredes externas de la arteria y la vena, pero no se contuvo dentro de los vasos mismos. CK18 y desmina se observaron solo dentro de los vasos, la desmina se restringió a las capas media y externa.

Ninguno de estos marcadores se observó dentro del cordón umbilical (datos no mostrados).

- 20 La vimentina, la desmina, la actina del músculo liso alfa, la citoqueratina 18, el factor de von Willebrand y el CD 34 se expresan en células del cordón umbilical humano. Residencia en *in vitro* estudios de caracterización que muestran que solo se expresan vimentina y alfa-actina de músculo liso, los datos sugieren que el procedimiento actual de aislamiento celular derivado del cordón umbilical recolecta una subpoblación de células o que las células aisladas cambian la expresión de marcadores para expresar vimentina y alfa-lisa actina muscular.

25

Ejemplo 9

Secreción de factores tróficos

- 30 Se midió la secreción de factores tróficos seleccionados de UTC. Se seleccionaron los factores que tienen actividad angiogénica por ejemplo, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Rosen y col., Ciba Found. Symp., 1997; 212: 215-26); proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Salcedo y col., Blood, 2000; 96: 34-40); interleucina-8 (IL-8) (Li y col., J. Immunol., 2003; 170: 3369-76); factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hughes y col., Ann. Thorac. Surg. 2004; 77: 812-8); inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz 1 (TIMP1); angiopoyetina 2 (ANG2); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFbb); trombopoyetina (TPO); factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF); factor 1 derivado del estroma (SDF-1alfa), actividad neurotrófica/neuroprotectora (factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Cheng y col., Dev. Biol., 2003; 258: 319-33); interleucina-6 (IL-6); proteína quimiotáctica de granulocitos-2 (GCP-2); factor de crecimiento transformante beta2 (TGFbeta2)); o actividad de quimiocinas (proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 alfa), proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta (MIP1beta), quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), Rantes (regulado en la activación, células T normales expresadas y secretadas); I309; timo y la quimiocina regulada por activación (TARC); Eotaxina; quimiocina derivada de macrófagos (MDC); y (IL-8).

- 45 Las células derivadas del cordón umbilical, así como fibroblastos humanos derivados del prepucio neonatal humano, se cultivaron en medio de crecimiento sobre matraces T75 revestidos con gelatina. Las células se crioconservaron en el pase 11 y se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar, se añadió medio de crecimiento a las células, seguido de transferencia a un tubo de centrifuga de 15 ml y centrifugación de las células a 150 x g durante 5

minutos. El sedimento celular se resuspendió en 4 ml de medio de crecimiento, y las células se contaron. Las células fueron sembradas a 5.000 células/cm² en matraces T75 que contienen cada uno 15 ml de medio de crecimiento y se cultivaron durante 24 horas. El medio se cambió a un medio sin suero (DMEM-glucosa baja (Gibco), seroalbúmina bovina al 0,1% (p/v) (Sigma), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 µg/ml, Gibco)) durante 8 horas. Se recogió medio sin suero acondicionado al final de la incubación mediante centrifugación a 14,000 x g durante 5 minutos y se almacenó a -20°C.

Para estimar el número de células en cada matraz, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se separaron usando 2 ml de tripsina/EDTA (Gibco). La actividad de tripsina se inhibió mediante la adición de 8 ml de medio de crecimiento. Las células se centrifugaron a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de crecimiento. El número de células se estimó con un hemocitómetro.

Las células se cultivaron a 37 °C en 5% de CO₂ y oxígeno atmosférico. La cantidad de MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1 alfa, GCP-2, IL-8 y TGF-beta2 producida por cada muestra de células se determinó mediante ELISA (R & D Systems, Minneapolis, Mn). Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores presentados son picogramos por ml por millón de células (n = 2, sem).

Se midieron quimiocinas (MIP1alfa, MIP1beta, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, Eotaxina, MDC, IL8), BDNF y factores angiogénicos (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGFbb, TPO, HB-EGF utilizando matrices proteómicas SearchLight (Pierce Biotechnology Inc.). Las matrices proteómicas son ELISA sándwich multiplexadas para la medición cuantitativa de dos a dieciséis proteínas por pozo. Las matrices se producen detectando un patrón de 2 x 2, 3 x 3 o 4 x 4. de cuatro a dieciséis anticuerpos de captura diferentes en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Siguiendo un procedimiento de ELISA tipo sándwich, se toma una imagen de la placa completa para capturar la señal quimioluminiscente generada en cada punto dentro de cada pocillo de la placa. es proporcional a la cantidad de proteína diana en el estándar o muestra original.

MCP-1 e IL-6 fueron secretadas por PPDC derivados del ombligo y fibroblastos dérmicos (Tabla 9-1). SDF-1alpha y GCP-2 fueron secretados por fibroblastos. GCP-2 e IL-8 fueron secretados por PPDC derivados de ombligo. TGF-beta2 no se detectó de ningún tipo de célula por ELISA.

Tabla 9–1. Resultados de ELISA: Detección de factores tróficos

	MCP–1	IL–6	VEGF	SDF–1α	GCP–2	IL–8	TGF–beta2
Fibroblasto	17 ± 1	61 ± 3	29 ± 2	19 ± 1	21 ± 1	ND	ND
Umbilical (022803)	1150 ± 74	4234 ± 289	ND	ND	160 ± 11	2058 ± 145	ND
Umbilical (071003)	2794 ± 84	1356 ± 43	ND	ND	2184 ± 98	2369 ± 23	ND

Clave: ND: No detectado., +/- sem

Ensayo ELISA multiplexado Searchlight™. TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1beta, MCP1, RANTES, I309, TARC, MDC, e IL–8 se secretaron de PPDC derivados de ombligo (tablas 9-2 y 9-3). No se detectaron Ang2, VEGF o PDGFbb.

Tabla 9–2. Resultados del ensayo ELISA multiplexado Searchlight™

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
hFB	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

Clave: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivadas umbilicales (022803)), U3 (PPDC derivadas umbilicales (071003)), ND: No Detectado.

Tabla 9-3. Resultados del ensayo ELISA multiplexado Searchlight™

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	I309	TARC	Eotaxina	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
U1	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

Clave: hFB (fibroblastos humanos), U1 (PPDC derivadas umbilicales (022803)), U3 (PPDC derivadas umbilicales (071003)), ND: No Detectado

Las células derivadas de umbilicales secretaron una cantidad de factores tróficos. Algunos de estos factores tróficos, como HGF, bFGF, MCP-1 e IL-8, desempeñan papeles importantes en la angiogénesis. Otros factores tróficos, como BDNF e IL-6, tienen papeles importantes en la regeneración o protección neuronal.

5

Ejemplo 10

Ensayo de actividad de la telomerasa

10 La telomerasa funciona para sintetizar repeticiones teloméricas que sirven para proteger la integridad de los cromosomas y para prolongar la vida replicativa de las células (Liu, K, y col., PNAS, 1999; 96: 5147-5152) La telomerasa consta de dos componentes, la plantilla de ARN de telomerasa (hTER) y la transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). La regulación de la telomerasa se determina mediante la transcripción de hTERT pero no hTER. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) para el ARNm de hTERT es, por lo tanto, un procedimiento aceptado para determinar la actividad de la telomerasa de las células.

15

Aislamiento celular

20 Se realizaron experimentos de PCR en tiempo real para determinar la producción de telomerasa de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano. Se prepararon células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de acuerdo con los ejemplos anteriores y los ejemplos expuestos en la patente de Estados Unidos n.º 7,510,873. En general, los cordones umbilicales obtenidos del National Disease Research Interchange (Filadelfia, Pensilvania) después de una administración normal se lavaron para eliminar la sangre y los desechos y se disociaron mecánicamente. El tejido se incubó luego con enzimas de digestión que incluyen colagenasa, dispasa e hialuronidasa en medio de cultivo a 37 °C. Se cultivaron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano de acuerdo con los procedimientos expuestos en los ejemplos de la solicitud '012. Las células madre mesenquimatosas y los fibroblastos dérmicos normales de la piel (cc-2509 lote # 9F0844) se obtuvieron de Cambrex, Walkersville, Maryland. Una célula celular pluripotencial de células embrionarias testiculares (teratoma) nTera-2 (NTERA-2 cl.DI) (Ver, Plaia y col., Stem Cells, 2006; 24 (3): 531-546) se compró a ATCC (Manassas, Virginia) y se cultivó de acuerdo con los procedimientos establecidos en la patente de Estados Unidos n.º 7.510,873.

25

30

Aislamiento total de ARN

35 El ARN se extrajo de las células usando el kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se eluyó con 50 µl de agua tratada con DEPC y se almacenó a -80 °C. El ARN se transcribió de forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 60 minutos y 95 °C durante 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

35

PCR en tiempo real

40 La PCR se realizó en muestras de ADNc utilizando Applied Biosystems Assays-On-Demand™ (también conocido como TaqMan® Gene Expression Assays) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems). Este kit comercial es ampliamente utilizado para analizar la telomerasa en células humanas. Brevemente, se mezclaron hTert (gen de telomerasa humana) (Hs00162669) y GAPDH humano (un control interno) con ADNc y mezcla maestra TaqMan® Universal PCR usando un sistema de detección de secuencia 7000 con software ABI prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Las condiciones del ciclo térmico fueron inicialmente 50 °C durante 2 minutos y 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de PCR se analizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

40

45

50 Las células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (número de acceso ATCC PTA-6067), fibroblastos y células madre mesenquimatosas se analizaron para determinar el ARN hTert y el ARN 18S. Como se muestra en la Tabla 10-1, hTert, y por lo tanto la telomerasa, no se detectó en células derivadas de tejido de cordón umbilical humano.

55

Tabla 10-1

	hTert	ARN 18S
Células umbilicales (022803)	ND	+
Fibroblastos	ND	+
ND- no detectado; + señal detectada		

Se analizaron células derivadas de tejido de cordón umbilical humano (aislado 022803, número de acceso ATCC

PTA-6067) y células nTera-2 y los resultados no mostraron expresión de la telomerasa en dos lotes de células derivadas de tejido de cordón umbilical humano mientras que la célula de teratoma la línea reveló un alto nivel de expresión (Tabla 10-2).

5

Tabla 10-2

Tipo de célula	hTert		GAPDH		hTert norm
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	
nTera2	25,85	27,31	16,41	16,31	0,61
022803	–	–	22,97	22,79	–

Por lo tanto, se puede concluir que las células derivadas de tejido umbilical humano de la presente invención no expresan telomerasa.

10

Ejemplo 11

Crecimiento de UTC en microvehículos en reactor de matraz de centrifugación con impulsor

15 Materiales y procedimientos

Células. Las células del lote CBAT # 050604B pase 8 células se descongelaron y se expandieron en un matraz T225 para un pase.

20 *Microvehículos.* Se hidrataron perlas microvehículos Cytodex® 3 (GE Healthcare Life Sciences, n.º de cat. 17-0485) en PBS durante al menos 3 horas y se sometieron a autoclave.

Matraces de centrifugación. Matraz de centrifugación con conjunto de impulsor de cojinete superior interno, 100 ml y 250 ml (Bellco, Inc.).

25

Confluencia. La confluencia se define como que aproximadamente el 90% de los microvehículos observados en un campo de microscopía representativo tienen más de aproximadamente el 60% de su superficie cubierta con células.

30 *Pase.* El pase se define como la inoculación de un matraz giratorio que contiene microvehículos frescos con una parte alícuota de microvehículos confluentes obtenidos a partir de un cultivo de matraz giratorio separado.

35 *Inoculación y Cultivo.* Las células se recogieron del matraz T225 mediante tripsina y se añadieron partes alícuotas de $4,0E + 06$ a 330 mg de microesferas en un impulsor de 100 ml o un matraz giratorio de varilla de vidrio que contenía 40 ml de medio. Los frascos se enjuagaron con 5% de CO₂ gas durante 1 minuto antes de la incubación. La frecuencia de velocidad del inóculo fue 30 rpm durante 2 minutos cada 30 minutos durante 8 horas. A las ocho horas, el volumen del medio se aumentó a 100 ml y la velocidad del rotor se ajustó a rotación continua de 45 rpm y se incubó a 37 °C.

40 *Pase.* Pase 1- (matraz de 100 ml a 250 ml) Las células se cultivaron durante ocho días. Todos los microvehículos del matraz de 100 ml se recogen y se dejan separar del medio por gravedad. Se aspiró el medio y se volvieron a suspender los microvehículos en 10 ml de medio fresco. Después de pipetear para asegurar una distribución uniforme, se extrajeron 5 ml de medio con microvehículos y se entregaron en un matraz giratorio de 250 ml. Aproximadamente 660 mg de microvehículos y medios Cytodex® 3 hidratados y tratados en autoclave también se añadieron al matraz. El volumen del medio se aumentó a 200 ml y los matraces se limpiaron con un 5% de CO₂ gas durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad del rotor se ajustó a rotación continua de 45 rpm y se incubó a 37 °C. Las células restantes se recogieron mediante tripsinización y se contaron usando un instrumento Guava PCA (Guava Technologies, Hayward, CA).

50 *Pase 2 - (matraz de 250 ml a 250 ml)* Las células se cultivaron durante seis días. Todos los microvehículos del matraz de 250 ml se recogen y se dejan separar del medio por gravedad. Se aspiró el medio y se volvieron a suspender los microvehículos en 25 ml de medio nuevo. Después de pipetear para asegurar una distribución uniforme, se extrajeron 5 ml de medio con microvehículos y se entregaron en un matraz giratorio de 250 ml. Aproximadamente 660 mg de microvehículos y medios Cytodex® 3 hidratados y tratados en autoclave también se añadieron al matraz. El volumen del medio se aumentó a 200 ml y los matraces se limpiaron con un 5% de CO₂ gas durante 1 minuto antes de la incubación. La velocidad del rotor se ajustó a rotación continua de 45 rpm y se incubó a 37 °C. Las células restantes se recogieron mediante tripsinización y se contaron usando un instrumento Guava PCA.

55

60 *Intercambio de medios.* Los matraces de centrifugación se retiraron del cultivo y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad hasta el fondo del matraz. Aproximadamente la mitad del volumen del medio se eliminó por

aspiración y se reemplazó con un volumen igual de medio fresco. Los matraces se limpiaron con un 5% de CO₂ gas durante 1 minuto y regresó a la cultura. El intercambio de medios se realizó el día 1 y el día 4.

5 *Tinción de viabilidad.* Se retiró una alícuota de 1 ml del matraz y se dejó sedimentar a los microvehículos por gravedad. El medio se eliminó por aspiración y se reemplazó con 1 ml de solución de tinción de vivas/muertas (Molecular Probes, n.º de catálogo L3224) y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Después de la incubación, se aplicó una alícuota de 20 microlitros a un portaobjetos de vidrio y se observó microscopia fluorescente. Las células vivas se tiñen de verde, las células muertas se tiñen de rojo. Los campos microscópicos se analizaron manualmente para evaluar la distribución y la proporción de células vivas y muertas adheridas a los microvehículos. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

15 *Cosecha celular.* Se recogieron microvehículos del matraz de centrifugación, se lavaron tres veces en PBS y se distribuyeron uniformemente entre dos tubos cónicos de 50 ml. Cada tubo se incubó con 25 ml de tripsina durante 10 minutos a 37°C. Los tubos se llevaron a un volumen de 50 ml con PBS y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. Las células que contenían sobrenadante se recogieron por aspiración y se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml previamente llenados con 2,5 ml de FBS (produciendo una solución de FBS al 5% para inactivar la tripsina). Este procedimiento se repitió cuatro veces con cada fracción recogida por separado. Todas las células recogidas se centrifugaron, se resuspendieron en medio de crecimiento que contenía suero, y las células se contaron usando un instrumento Guava PCA.

25 *Cultivo estático en matraz T.* Se utiliza una alícuota de células recolectadas del matraz T225 para sembrar dos matraces T225 y se incuban durante cuatro días utilizando los procedimientos indicados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 10/877012. Las células fueron cosechadas y analizadas por citometría de flujo

30 *Citometría de flujo.* Las células cosechadas se analizaron mediante citometría de flujo usando un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) para determinar el perfil marcador de la superficie celular. Todos los anticuerpos adquiridos de BD PharMingen (San Diego, CA).

30 Resultados

35 *Cosecha celular.* La Tabla 11-1 muestra las fracciones de cosecha, los rendimientos celulares y la viabilidad por pase de la línea celular UTC 050604B expandida desde el pase nueve al pase once en microvehículos Cytodex® 3 en cultivos de matraces de centrifugación.

Tabla 11-1: Cosecha celular

N.º de pase	Fracciones	Células totales	Promedio de viabilidad (%)
Inoculación	4	2,85 x10 ⁷	99,7 ± 0,19
1	8	9,34 x10 ⁷	99,2 ± 2,65
2	4	8,80 x10 ⁷	94,4 ± 1,92

40 *Cinética celular.* La Tabla 11-2 muestra la cinética de crecimiento de la línea de células UTC 050604B expandida desde el pase nueve al pase once en microvehículos Cytodex® 3 en cultivos de matraces con agitador. La tabla muestra que el total de duplicaciones fue 7.48, y el promedio de horas por duplicado fue de 69.53 (± 17,52) horas.

Tabla 11-2: Cinética celular

Pase	Sembradas	rendimiento	Días	Expansión	Duplicación	Horas/duplicación
		2,00x10 ⁶	0	1		
Inoculación	2,00x10 ⁶	2,85x10 ⁷	8	14,3	3,83	50,09
1	2,85x10 ⁷	9,34x10 ⁷	6	3,28	1,71	84,12
2	2,30x10 ⁷	8,80x10 ⁷	6	3,83	1,94	74,39

45 *Tinción de vivas/muertas.* El análisis de la alícuota del microvehículo teñido vivo/muerto muestra la mayoría de las superficies del microvehículo cubiertas con células teñidas de verde (viables) con escasos focos de núcleos teñidos de rojo (muertos). Las células exhiben una morfología similar a la morfología de las células cultivadas en condiciones estáticas.

50 *Análisis de citometría de flujo.* La Tabla 11-3 muestra los resultados ("+ positivo" o "negativo") para marcadores de superficie celular expresados por células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) cosechadas microvehículos

en matraces de centrifugación versus hUTC cosechadas del cultivo en matraces T estáticos. La tabla muestra que los marcadores expresados por las células producidas por los dos procedimientos fueron consistentes.

5 **Tabla 11-3:** Comparación de la expresión de proteínas de la superficie celular por células Umb 050604B expandidas en matraces T estáticos o en microvehículos Cytodex® 3 en sistemas de matraces de centrifugación y analizadas mediante citometría de flujo

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

10 **Conclusión:** Se cultivaron células derivadas de tejido umbilical humano (hUTC) en microvehículos Cytodex® 3 en biorreactores de matraz con agitador impulsor. Las células lograron 7.48 duplicaciones de población durante más de veinte días y tuvieron un tiempo medio de duplicación de la población de 69 horas. La viabilidad celular por pase varió de 94.4% a 99.7%. El análisis para la expresión de trece marcadores de superficie celular en hUTC cultivadas en microvehículos fue consistente con la expresión del marcador de superficie celular por hUTC cultivadas en matraces T de cultivo celular. Este ejemplo indica que los microvehículos pueden usarse para sembrar, expandir y
15 cosechar hUTC en sistemas de biorreactores.

Ejemplo 12

20 **Crecimiento de células hUTC expandidas sobre MGSA recubierto de colágeno y microvehículos PLGA en matraces de centrifugación**

Se investigó la capacidad de hUTC para unir materiales fabricados con biomateriales sintéticos reabsorbibles con un revestimiento de colágeno, incluida la capacidad de mantener la viabilidad en el cultivo de matraces centrífugos y de proliferar al volver a sembrar en cultivo estático. Los hUTC expandidos se sembraron en microvehículos de poli (D, L-láctido-co-glicolida) (PLGA) y poli (monoestearoilglicérido co-succínico) (MGSA) recubiertos o no recubiertos de colágeno. Los microvehículos con células se cultivaron en matraces de centrifugación durante cinco días, se recogieron mediante tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos.

Materiales y procedimientos

30 .

Tabla 12-1 Microvehículos

Microvehículo	Fabricante	Procedimiento del proceso	Tamaño promedio (μm)
PLGA (50/50) IV 0,43	Alkermes (Willington, OH)	SCF	158
MGSA I	Ethicon (Somerville, NJ)	SCF	195

35 **Preparación de microvehículos.** Humectación de microvehículos: Aproximadamente 1 g de cada uno de los microvehículos de MGSA y PLGA se suspendieron asépticamente en 25 ml de etanol al 70% durante 30 minutos para humedecer los microvehículos. El etanol se eliminó por aspiración y los microvehículos se enjuagaron tres veces con PBS y se volvieron a suspender 25 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco.

40

Recubrimiento de colágeno Los microvehículos en húmedo (PBS) se granularon mediante centrifugación, el PBS se eliminó mediante aspiración y los microvehículos se resuspendieron en una solución de colágeno al 2,9% (Vitrogen 1000, Cohesion, Inc. Palo Alto, CA). Los microvehículos se incubaron en colágeno durante 30 minutos. El colágeno residual se eliminó por aspiración y las micropartículas recubiertas de colágeno se lavaron tres veces con PBS.

5

Tabla 12-2 Cantidades de microvehículos utilizadas.

Microvehículo	Miligramo	N.º células sembradas
PLGA (50/50) sin recubrimiento	260	3,50 x 10 ⁶
PLGA (50/50) con recubrimiento	260	3,50 x 10 ⁶
MGSA I sin recubrimiento	330	3,50 x 10 ⁶
MGSA I con recubrimiento	330	3,50 x 10 ⁶

Inoculación y cultivo. Los materiales, tipo de célula, medio de crecimiento, matraz de centrifugación, inoculación y condiciones de cultivo, intercambio de medios, tinción de viabilidad y procedimientos de cosecha de células usados en el Ejemplo 11 se usaron en este ejemplo.

10

Resultados

15

Tabla 12-3 Cosecha celular

Microvehículo	Células totales	Viabilidad (%)
PLGA (50/50)) sin recubrimiento	1,20 x 10 ⁶	98,6
PLGA (50/50) con recubrimiento	1,15 x 10 ⁶	97,6
MGSA I) sin recubrimiento	1,82 x 10 ⁶	99,0
MGSA I con recubrimiento	2,39 x 10 ⁶	97,8

Resiembra de las células cosechadas. células cosechadas de los microvehículos MGGA y PLGA recubiertos y no revestidos se volvieron a sembrar en T225 a aproximadamente 5.000 células/cm². Cuatro días después de la nueva siembra, las células cosechadas de ambos materiales proliferaron a más del 50 % de confluencia.

20

Las hUTC expandidas se sembraron en PLGA recubierto de colágeno y en microvehículo MGSA, se cultivaron en matraces de centrifugación durante cinco días, se recogieron mediante tripsinización y se volvieron a sembrar en cultivos estáticos. Las células que se cosecharon de los microvehículos sintéticos eran viables en más del 90%. Las células de reinyección se expandieron en cultivo estático en cuatro días, demostrando la retención de su capacidad proliferativa. Este ejemplo demuestra la capacidad de los biomateriales sintéticos para ser utilizados como microvehículos para el cultivo de matraces de centrifugación.

25

Ejemplo 13

30

Expansión de hUTC en microvehículos en cultivo continuo de matraces de centrifugación

El objetivo de este estudio fue cultivar de manera continua adhesivo de hUTC expandidas a microvehículos comerciales en matraces con agitador sobre múltiples duplicaciones de población. La capacidad de expandir hUTC en microvehículos sobre múltiples duplicaciones de población servirá para que un sistema modelo se amplíe para la producción a gran escala de hUTC para aplicaciones de terapia celular. Se evaluaron dos aislados de HUTC, aislados 120304, expandidas y crioconservadas en condiciones de investigación, y CNTO 2476, aislados, expandidas y crioconservadas en condiciones de GMP. También se evaluaron microvehículos comerciales Cytodex® 1 o Hillex® II. Las células crioconservadas se descongelaron y se usaron para inocular inmediatamente cultivos de frascos rotativos. Las células se cultivaron continuamente a lo largo de múltiples pases hasta que la célula alcanzó aproximadamente el doble de la población. 30. También se cultivaron hUTC estadísticamente en matraces T225 como control.

40

El aislado de hUTC 120304 crioconservado en una población que duplica 12.8 fue capaz de descongelarse y expandirse en microvehículos Cytodex® 1 y Hillex® II a una población que se duplicó en 28.6 y 28.7, respectivamente. Las horas por duplicación de población fueron consistentes desde el pase hasta el pase, lo que indica un crecimiento logarítmico estable y fue consistente con la cinética de crecimiento del matraz T. El aislado de hUTC CNTO 2476 crioconservado en una población que duplicaba a 22,6 fue capaz de descongelarse y expandirse en microvehículos Cytodex® 1 y Hillex® II a una población que se duplicó en 33.2 y 31.0, respectivamente. Las horas por duplicado de la población fueron consistentes desde el pase hasta el pase, lo que indica un crecimiento

50

logarítmico estable y también fue consistente con la cinética de crecimiento del matraz T. El análisis estadístico por ANOVA de una vía de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestra diferencia significativa de la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas. ($p = 0.988$). La expresión de la proteína de la superficie celular se mantuvo constante en la cosecha final para todas las condiciones evaluadas.

Este ejemplo demuestra la capacidad de hUTC para expandirse a aproximadamente 30 duplicaciones de población en microvehículos de una manera estable y consistente que mantiene el fenotipo de proteína de superficie de la célula.

Materiales y procedimientos

Células. Se usaron clones duplicados (PD) 12 aislados de hUTC expandidas crioconservadas y el aislado CNTO 2476 de hUTC lote 25126078 PD 22.

Medios de cultivo. Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) – bajo en glucosa (Gibco - Grand Island, NY), 15 % de FBS (HyClone - Logan UT), penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco - Grand Island, NY), betamercaptoetanol (BME) (Sigma- St. Louis, MO).

Microvehículos. Los microvehículos Cytodex® 1 (GE Health Sciences - Piscataway, NJ) se hidrataron en PBS durante al menos 3 horas y se autoclavaron. Se usaron microvehículos Cytodex® 1 a una concentración de 3 g/l. Los microvehículos Hillex® II (SoloHill Engineering, Inc., Ann Arbor, MI) se hidrataron en agua desionizada durante al menos 30 minutos en autoclave. Los microvehículos Hillex® II se usaron a una concentración de 12 g/l.

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

Inoculación y cultivo en matraz de centrifugación de 100 ml. Los viales crioconservados de hUTC se descongelaron, lavaron y resuspendieron en medio de crecimiento. Se añadieron $6,6 \times 10^6$ hUTC a 3000 mg de Cytodex® 1 ($5,0 \times 10^3$ células por cm^2) en un matraz de centrifugación de 100 ml que contenía 100 ml de medio y se colocaron en incubadores de cultivo tisular a 37°C y se incubaron durante tres a cuatro días. La placa giratoria se ajustó a rotación continua a 60 rpm. $3,1 \times 10^6$ hUTC se añadieron a 1,2 g de Hillex® II ($5,0 \times 10^3$ células por cm^2) en un matraz de centrifugación de 100 ml que contiene 100 ml de medio y colocado en una placa giratoria ajustada a rotación continua a 60 rpm. Placas giratorias colocadas en 5% de CO_2 .

Pase de cultivo de un matraz de centrifugación de 100 ml a un matraz de centrifugación de 500 ml. Se retiró un matraz de centrifugación de ml de la placa giratoria y se dejó sedimentar a los microvehículos. El sobrenadante de los medios se elimina por aspiración. El paquete de microvehículo restante con células adherentes se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento fresco. Los microvehículos con células adherentes se transfirieron asépticamente mediante pipeta a un matraz de centrifugación de 500 ml que contenía 480 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de Hillex® II (6 g de contenido final de microvehículo) o 1,2 g de Cytodex® 1 (1,5 g de contenido final de microvehículo). El matraz de centrifugación se colocó entonces en una placa giratoria ajustada a rotación continua a 60 rpm. Placas giratorias colocadas en 5% de CO_2 , Incubadores de cultivo tisular a 37 °C y se incubaron durante tres a cuatro días.

Pase de cultivo de un matraz de centrifugación de 500 ml a cinco matraces de centrifugación de 500 ml. Se retiró un matraz de centrifugación de ml de la placa giratoria y se dejó sedimentar a los microvehículos. El sobrenadante de los medios se elimina por aspiración. El paquete de microvehículo restante con células adherentes se resuspendió en 50 ml de medio de crecimiento fresco. Se transfirieron asépticamente alícuotas separadas de 10 ml de los microvehículos con células adherentes mediante una pipeta a cinco matraces rotativos de 500 ml cada uno que contenían 490 ml de medio de crecimiento fresco y 4,8 g de Hillex® II (6 g de contenido final de microvehículo) o 1,2 g de Cytodex® 1 (1,5 g de contenido final del microvehículo). Los matraces de centrifugación se colocaron luego en una placa giratoria ajustada a rotación continua a 60 rpm. Placas giratorias colocadas en 5% de CO_2 , Incubadores de cultivo tisular a 37 °C y se incubaron durante tres a cuatro días.

Cosecha de células adherentes a microvehículos Cytodex® 1. El matraz de centrifugación de 500 ml se retiró de la placa giratoria y los microvehículos con células adherentes se dejaron sedimentar por gravedad. El sobrenadante de los medios se eliminó mediante aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz de centrifugación y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El sobrenadante de PBS se eliminó por aspiración. Se añadieron 500 ml de glucosa baja en DMEM al matraz de centrifugación. El matraz de centrifugación se incubó a continuación en una placa giratoria durante 20 minutos a 60 rpm. El matraz de centrifugación se retiró de la placa giratoria y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El sobrenadante de glucosa baja en DMEM se eliminó mediante aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz de centrifugación. El matraz de centrifugación se incubó a continuación en una placa giratoria durante 20 minutos a 60 rpm. El matraz de centrifugación se retiró de la placa giratoria y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. El sobrenadante de PBS se eliminó por aspiración. Se añadieron 250 ml de selección de TrypLE al matraz de centrifugación. El matraz de centrifugación se

incubó a continuación en una placa giratoria durante 10 minutos a 60 rpm. El matraz de centrifugación se retiró de la placa giratoria y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. Utilizando una pipeta serológica de 50 ml, se agitó la solución de selección de microtransvehículos TrypLE™ pipeteando arriba y abajo ~ 10 veces para disociar células adherentes residuales de los microvehículos. Después, se añadieron 250 ml de PBS al matraz de centrifugación y se dejó que los microvehículos sedimentaran por gravedad. El sobrenadante que contiene la célula se recoge por pipeteo repetido y se transfiere a múltiples tubos cónicos precargados con 5 ml de FBS y una unidad de filtro de 100 µm insertada en la abertura del tubo. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 300rcf, el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en medio de crecimiento..

10 *Cosecha de células adherentes a microvehículos Hillex® II.* El matraz de centrifugación de 500 ml se retiró de la placa giratoria y los microvehículos con células adherentes se dejaron sedimentar por gravedad. El sobrenadante de los medios se eliminó mediante aspiración. Se añadieron 500 ml de PBS al matraz de centrifugación y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. Se añadieron 100 ml de la selección TrypLE™ al matraz de centrifugación. El matraz de centrifugación se incubó a continuación en una placa giratoria durante 10 minutos a 60 rpm. El matraz de centrifugación se retiró de la placa giratoria y los microvehículos se dejaron sedimentar por gravedad. Utilizando una pipeta serológica de 25 ml, se agitó la solución de selección de microtransvehículos TrypLE™ pipeteando arriba y abajo ~ 10 veces para disociar células adherentes residuales de los microvehículos. La célula que contiene el sobrenadante se recoge mediante pipeteo repetido y transferencia a múltiples tubos cónicos precargados con 5 ml de FBS y una unidad de filtro de 100 µm insertada en la abertura del tubo. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 300rcf, el sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en medio de crecimiento.

25 *Tinción de viabilidad.* Se transfirió una alícuota de 1 ml de medio y microvehículos a un tubo cónico de 15 ml y se dejó que los microvehículos se separaran por gravedad. El medio se eliminó mediante aspiración y se reemplazó con 1 ml de solución de tinción de vivas/muertas (Molecular Probes, nº de catálogo L3224) y se incubó a 15°C a 37°C. Después de la incubación, se aplicó una alícuota de 20 µl a un portaobjetos de vidrio y se observó por microscopia fluorescente. Las células vivas se tiñen de verde. Los campos microscópicos se analizaron manualmente para evaluar la distribución de células viables adheridas a los microvehículos. Se evaluaron al menos tres campos microscópicos y se contó el porcentaje aproximado de células viables.

30 *En recuentos celulares de cultivo: ensayo de liberación de núcleos.* Se obtuvo una alícuota de 10 ml (matraz de 100 ml) o una alícuota de 10 ml (matraz de 500 ml) de una suspensión microvehículo homogénea del recipiente del matraz de centrifugación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Los microvehículos se separaron por gravedad y el sobrenadante se eliminó mediante aspiración. Los microvehículos se lavaron una vez con 10 ml de PBS, los microvehículos se separaron por gravedad y el sobrenadante de PBS se eliminó mediante aspiración. Los microvehículos se incubaron durante una hora a 37 °C en solución de liberación de núcleos (ácido cítrico 0,1 M (Sigma-St. Louis, MO) que contenía violeta cristal al 0,1% p/v (Sigma-St. Louis, MO)). Después de la incubación, se añadió una alícuota de 100 µl de la solución de liberación de núcleos que contenía microvehículos a 100 µl de PBS. Luego se cargó una alícuota de 10 µl de esta solución en un hemocitómetro y se contaron los núcleos liberados.

40 *En recuentos de células de cultivo: ensayo TrypLE™.* Se obtuvo una alícuota de 5 ml (matraz de 100 ml) o alícuota de 10 ml (matraz de 500 ml) de una suspensión microvehículo homogénea del recipiente del matraz de centrifugación y se transfirió a un tubo de 15 ml. Los microvehículos se separaron por gravedad y el sobrenadante se eliminó mediante aspiración. Los microvehículos se lavaron una vez con 10 ml de PBS, los microvehículos se separaron por gravedad y el sobrenadante de PBS se eliminó mediante aspiración. Los microvehículos se incubaron durante diez minutos a 37 °C en una selección TrypLE™. Después de la incubación, se añaden 5 ml de PBS y se permite que los microvehículos se separen por gravedad. La célula que contiene el sobrenadante se recoge mediante pipeteo repetido y se transfiere a múltiples tubos cónicos precargados con 1 ml de FBS. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 300 rcf, el sobrenadante se decantó, las células se resuspendieron en medio de crecimiento, y se utilizó una alícuota para determinar el recuento de células usando un instrumento Guava PCA (Guava Technologies, Hayward, CA).

55 *Cultivo estático en matraz T.* Los viales crioconservados de hUTC se descongelaron, lavaron y resuspendieron en medio de crecimiento. Las células se cultivaron estáticamente en T225 en múltiples pases usando los procedimientos establecidos en US2004877012A.

60 *Citometría de flujo.* Las hUTC cosechadas se analizaron mediante citometría de flujo usando un instrumento Becton-Dickinson FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) para determinar el perfil del marcador de superficie celular usando los procedimientos indicados en US2004877012A. Todos los anticuerpos se adquirieron en BD Sciences Pharmingen (San Diego, CA).

Resultados

Tabla 13-1: Cultivo continuo de aislado de hUTC 120304 en microvehículos Cytodex® 1.

65

N.º de pase	Sembradas	Rendimiento	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/duplicaciones
6 (siembra)		5,32E+06	2,03E+00	1,28E+01		
6	5,32E+06	4,71E+07	3,15E+00	1,59E+01	4,00	30,51
7	8,96E+06	7,30E+07	3,03E+00	1,89E+01	3,00	23,79
8	6,60E+06	3,30E+07	2,32E+00	2,12E+01	3,00	31,01
9	6,60E+06	3,90E+07	2,56E+00	2,38E+01	3,00	28,09
10	3,90E+07	2,17E+08	2,48E+00	2,63E+01	4,00	38,77
11	2,17E+08	1,10E+09	2,34E+00	2,86E+01	4,00	41,00

Tabla 13-2: Cultivo continuo de aislado de hUTC 120304 en microvehículos Hillex® II.

N.º de pase	Sembradas	Rendimiento	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/Duplicación
6 (siembra)		5,32E+06	2,03E+00	1,28E+01		
6	5,32E+06	4,71E+07	3,15E+00	1,59E+01	4,00	30,51
7	8,96E+06	7,30E+07	3,03E+00	1,89E+01	3,00	23,79
8	3,00E+06	1,90E+07	2,66E+00	2,16E+01	3,00	27,04
9	3,80E+06	2,30E+07	2,60E+00	2,42E+01	3,00	27,72
10	2,30E+07	2,64E+08	3,52E+00	2,77E+01	4,00	27,27
11	2,11E+08	4,16E+08	9,79 E-01	2,87E+01	3,00	73,52

Tabla 13-3. Cultivo continuo de aislado de hUTC 2476CNTO 2476 en microvehículos Cytodex® 1

5

N.º de pase	Sembradas	Rendimiento	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/Duplicación
6 (siembra)		6,30E+05		2,26E+01		
6	6,30E+05	3,44E+06	2,45E+00	2,50E+01	3,00	29,40
7	3,44E+06	5,20E+07	3,92E+00	2,90E+01	4,00	24,50
8	4,00E+07	1,60E+08	2,00E+00	3,10E+01	3,00	36,00
8	1,60E+08	7,67E+08	2,26E+00	3,32E+01	4,00	42,46

Tabla 13-4. Cultivo continuo de aislado de hUTC 2476CNTO 2476 en microvehículos Hillex® II

N.º de pase	Sembradas	Rendimiento	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/Duplicación
6 (siembra)		1,68E+06		2,26E+01		
6	1,68E+06	1,29E+07	2,94E+00	2,55E+01	4,00	32,64
7	1,29E+07	5,30E+07	2,04E+00	2,76E+01	3,00	35,32
8	5,30E+07	5,60E+08	3,40E+00	3,10E+01	5,00	35,28

Tabla 13-5: Cultivo continuo del aislado de hUTC 120304 en matraces T225

N.º de pase	Sembradas	Rendimiento	Duplicación	Duplicaciones totales	Tiempo (días)	Horas/Duplicación
-------------	-----------	-------------	-------------	-----------------------	---------------	-------------------

6 (siembra)		1,12E+07	2,03E+00	1,28E+01		
6	1,12E+07	3,05E+07	1,45E+00	1,42E+01	2,00	33,21
7	2,20E+06	2,03E+07	3,21E+00	1,74E+01	4,00	29,94
8	3,75E+05	1,50E+06	2,00E+00	1,94E+01	3,00	36,00
9	3,75E+05	1,85E+06	2,30E+00	2,17E+01	4,00	41,69
10	3,75E+05	2,39E+06	2,67E+00	2,44E+01	3,00	26,95
11	7,50E+05	3,14E+06	2,07E+00	2,64E+01	4,00	46,47
12	3,14E+06	2,02E+07	2,69E+00	2,91E+01	3,00	26,81
13	2,02E+07	1,14E+08	2,50E+00	3,16E+01	4,00	38,45

Tabla 13–6 Comparación de la expresión de proteínas de la superficie celular por hUTC expandida en microvehículos y matraces T y analizada mediante citometría de flujo.

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

5 El aislado de hUTC 120304 crioconservado en una población que duplica 12.8 fue capaz de descongelarse y expandirse en microvehículos Cytodex® 1 y Hillex® II a una población que se duplicó en 28.6 y 28.7, respectivamente. Las horas por duplicación de población fueron consistentes desde el pase hasta el pase, lo que indica un crecimiento logarítmico estable y fue consistente con la cinética de crecimiento del matraz T. El aislado de hUTC CNTO 2476 crioconservado en una población que duplicaba a 22,6 fue capaz de descongelarse y expandirse en microvehículos Cytodex® 1 y Hillex® II a una población que se duplicó en 33.2 y 31.0, respectivamente. Las horas por duplicado de la población fueron consistentes desde el pase hasta el pase, lo que indica un crecimiento logarítmico estable y también fue consistente con la cinética de crecimiento del matraz T. El análisis estadístico por ANOVA de una vía de todas las horas por puntos de datos de duplicación de la población no muestra diferencia significativa de la cinética de crecimiento de hUTC para todas las condiciones probadas. (p = 0.988). Además, la expresión de la proteína de la superficie celular se mantuvo constante en la cosecha final para todas las condiciones probadas. Estos datos demostraron la capacidad del hUTC para expandirse a aproximadamente 30 duplicaciones de población en microvehículos de una manera estable y consistente que mantiene el fenotipo de proteína de superficie de la célula.

20 Aunque la invención se ha descrito e ilustrado en la presente memoria mediante referencias a diversos materiales, procedimientos y ejemplos específicos, se entiende que la invención no está restringida a las combinaciones particulares de material y procedimientos seleccionados para ese fin. Numerosas variaciones de tales detalles pueden implicarse como apreciarán los expertos en la materia.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical que comprende:

- 5 a. cultivar células derivadas de tejido de cordón umbilical sembradas en microvehículos en un medio de cultivo que comprende aminoácidos, vitaminas, sales, nucleósidos, ácido lipoico / tióctico, etanolamina, insulina, transferrina, selenio sódico, en el que el medio de cultivo se suplementa con suero, durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población inicial deseada;
- 10 b. añadir una solución nutritiva sin suero, después de que las células han alcanzado la densidad de población inicial deseada, en el que la solución de nutrientes sin suero comprende aminoácidos, vitaminas, sales, insulina, transferrina, etanolamina, ácido lipoico / ácido tióctico, selenio sódico, después de que las células hayan alcanzado la densidad de población inicial deseada; y
- 15 c. cultivar las células durante un período de tiempo suficiente para permitir que las células alcancen una densidad de población final deseada;

en el que las células derivadas de tejido de cordón umbilical se aíslan del tejido de cordón umbilical humano sustancialmente libre de sangre, son capaces de autorrenovarse y expandirse en cultivo, tienen el potencial de diferenciarse, expresar CD13, CD90, HLA-ABC, y no expresan CD34, CD117 y HLA-DR,

20 y en el que los nucleósidos son al menos 0,0001 g / l de timidina, y al menos 0,005 g / l de cada uno de adenosina, citidina, uridina y guanosina.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además sembrar las células en los microvehículos.

25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además aislar las células después de la etapa c.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento no requiere intercambio de medio.

30 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un sistema de cultivo en matraz de centrifugación.

35 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las características de las células antes y después del cultivo son sustancialmente las mismas, o en las que las características de las células antes y después del cultivo son las mismas.

40 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la densidad de población inicial deseada se logra después de 3 a 4 días.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los microvehículos tienen una superficie tratada con amina.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprende:

45 los aminoácidos L-arginina; L-cistina; L-cisteína; L-glutamina; glicina; L-histidina; L-isoileucina; L-leucina; L-lisina; L-metionina; L-fenilalanina; L-serina; L-treonina; L-triptófano; L-tirosina; L-valina; L-alanina; L-aspargina; ácido L-aspártico; ácido L-glutámico; L-prolina; y L-aurina;

50 las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B₁₂ (cianocobalamina);

las sales cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y una o más sales de fosfato de sodio; e

55 insulina; transferrina; ácido lipoico / ácido tióctico; etanolamina; selenito de sodio; y una o más fuentes de energía opcionalmente en el que la una o más fuentes de energía se seleccionan de D-glucosa y piruvato sódico.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el medio de cultivo comprende:

60 al menos 0,05 g/l de L-arginina; al menos 0,02 g/l de L-cistina; al menos 0,2 g/l de L-glutamina; al menos 0,01 g/l glicina; al menos 0,02 g/l de L-histidina; al menos 0,09 g/l de L-isoileucina; al menos 0,09 g/l de L-leucina; al menos 0,09 g/l de L-lisina; al menos 0,02 g/l de L-metionina; al menos 0,05 g/l de L-fenilalanina; al menos 0,03 g/l de L-serina; al menos 0,08 g/l de L-treonina; al menos 0,009 g/l de L-triptofan; al menos 0,08 g/l de L-tirosina; al menos 0,08 g/l de L-valina; al menos 0,005 g/l L-cisteína; al menos 0,0004 g/l de L-alanina; al menos 0,01 g/l de L-aspargina; al menos 0,006 g/l de L-ácido aspártico; al menos 0,03 g/l de L-ácido glutámico; al menos 0,005 g/l L-prolina; y al menos 0,0003 g/l de L-aurina;

65

de 5×10^{-6} g/l a 0,015 g/l de cada una de las vitaminas;

5 al menos 0,05 g / l de cloruro de calcio anhidro, al menos 0,1 g / l de cloruro de potasio; al menos 0,2 g / l de sulfato de magnesio, al menos 0,08 g / l de fosfato de sodio, monobásico, H_2O y al menos 0,0005 g / l de fosfato de sodio, heptahidrato dibásico($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$); y

10 al menos 0,003 g / l de insulina, al menos 0,05 g / l de transferrina, al menos 5×10^6 g / l de ácido lipoico / ácido tióctico, al menos 0,05 g / l de etanolamina y al menos 0,00004 g / l de selenito de sodio.

11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el medio de cultivo se suplementa con 2 a 20 % de FBS, en particular en el que medio de cultivo se complementa con 7,5 %, 10 % o 15 % de FBS, opcionalmente en el que el medio de cultivo comprende además putrescina. un estabilizador y/o un agente espumante.

15 12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la solución de nutrientes sin suero comprende:

20 los aminoácidos L-arginina, L-cistina, L-cisteína, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, l -triptofano, L-tirosina, L-valina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-prolina y L-aurina;

25 las vitaminas D-calcio pantotenato; cloruro de colina; ácido fólico; l-inositol; niacinamida; piridoxal; riboflavina; tiamina; d-biotina; piridoxina; y vitamina B_{12} (cianocobalamina);

30 las sales fosfato sódico monobásico y fosfato sódico heptahidrato dibásico;

35 los oligoelementos sulfato de cobre (II) pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), sulfato de cinc, heptahidratado, ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$); los nucleósidos adenosina, citidina, uridina y guanosina; e

40 insulina; transferrina; etanolamina; ácido lipoico / ácido tióctico; y selenito de sodio.

45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la solución de nutrientes sin suero comprende además un sustrato de energía, putrescina, un estabilizante y/o un agente espumante.

50

55

60

65

70

75

80