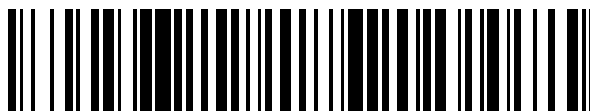


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 102**

51 Int. Cl.:

C07K 14/525 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2011 PCT/EP2011/065540**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12032112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2011 E 11758431 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2614078**

54 Título: **Medios y métodos de cultivo de células madre**

30 Prioridad:

10.09.2010 EP 10382244

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

09.05.2019

73 Titular/es:

**TIGENIX, S.A.U. (50.0%)
Parque Tecnológico de Madrid
28760 Tres Cantos, Madrid, ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOMBARDO, ELEUTERIO;
PLANELLES CARAZO, LOURDES y
ZONCA, MANUELA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 712 102 T3

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

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos de cultivo de células madre

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona nuevos usos de medios y métodos de cultivo de células madre, en particular, usos de medios y métodos de cultivo para expandir poblaciones de células madre mesenquimales.

10 Antecedentes

Existe un gran interés en los medios y métodos de cultivo para expandir poblaciones de células madre multipotentes, en particular, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (células ASC). Las aplicaciones clínicas de células madre multipotentes requieren métodos de cultivo celular reproducibles para proporcionar un número adecuado de células de calidad adecuada. Se han probado numerosos medios y métodos de cultivo diferentes para células madre multipotentes, con diversos grados de éxito.

Se reconoce ampliamente que sigue existiendo una gran necesidad de mejoras adicionales en los medios y métodos de cultivo de células madre multipotentes, en particular, de mejoras en los medios y métodos de cultivo de células ASC.

Los receptores similares al factor de necrosis tumoral (TNF) son miembros de una superfamilia de proteínas que son clave en la regulación de la maduración, la supervivencia y la apoptosis de las células inmunitarias. Dos miembros de esta superfamilia, la proteína A de maduración de linfocitos B (BCMA; TNFRSF17; BCM) y el activador transmembrana y el interactor de CAML (TACI; TNFRSF13B) comparten la capacidad de unirse a dos ligandos de TNF, el factor de activación de linfocitos B (BAFF; sinónimos BLyS, THANK, TALL-1 y zTNF4, TNFSF13B) y un ligando que induce la proliferación (APRIL; sinónimos TALL-2 y TRDL-1, TNFSF13A). Ambas son proteínas de tipo III de una sola pasada de membrana celular expresadas por células y asociadas con inmunidad humoral.

BCMA (miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral; CD269; proteína de maduración de linfocitos B) se expresa principalmente en los linfocitos B maduros y otras estirpes de linfocitos B, y desempeña un papel importante en el desarrollo, la función y la regulación de los linfocitos B. También desempeña un papel en la inmunidad humoral. El gen BCMA está ubicado en 16p13.1 y codifica una proteína transmembrana de 184 aminoácidos de tipo I (Swiss prot ID Q02223), que contiene un dominio extracelular de 54 aminoácidos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos y un dominio intracelular de 107 aminoácidos.

TACI (miembro 13B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral; activador transmembrana e interactor de CAML; CD267) es una proteína transmembrana que se expresa altamente en el bazo, timo, intestino delgado y leucocitos de sangre periférica. También se expresa en algunos linfocitos B, así como linfocitos T, y desempeña un papel en su crecimiento. Además, se asocia con la activación de una serie de factores de transcripción NFAT, API y NF kappa B, además de participar en la inmunidad humoral. El gen TACI está ubicado en 17p11.2 y codifica un aminoácido 293.

APRIL y BAFF son proteínas de la familia TNF secretadas por varios tipos de células, incluyendo las del sistema inmunitario, pero también las células epiteliales, los osteoclastos de la médula ósea y las células del estroma. APRIL y BAFF son factores de supervivencia y proliferación necesarios para el correcto desarrollo y función de los linfocitos B. Por otra parte, la expresión de APRIL y BAFF se encuentra en el suero y las lesiones tisulares de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide. Con respecto a las células madre, un estudio reciente informó que BAFF y APRIL modulan la velocidad de diferenciación adipogénica de hASC (Alexaki V. I., Notas G., Pelekanou V. *et al.* "Adipocytes as immune cells: differential expression of TWEAK, BAFF, and APRIL and their receptors (Fn14, BAFF-R, TACI, and BCMA) at different stages of normal and pathological adipose tissue development". *J Immunol* 2009;183:5948-5956).

Breve descripción de la invención

La invención proporciona nuevos usos de medios y métodos de cultivo para células madre mesenquimales, que proporcionan ventajas significativas frente a los medios y métodos de cultivo conocidos. La invención también proporciona composiciones relacionadas. Además, el presente documento también desvela medios de cultivo y complementos de medios de cultivo relacionados.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere al uso de un medio de cultivo para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que dicho medio comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- 65 (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;

- (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende: (a) un medio de cultivo; y (b) células madre mesenquimales, en la que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en la que el medio de cultivo comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de cultivo; (c) poner en contacto las células madre mesenquimales con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células madre en condiciones apropiadas; medio que comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (ii) un polipéptido 5 soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de un ligando de BCMA y TACI en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (ii) un polipéptido 5 soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un ligando de BCMA y TACI para su uso como un medicamento para el tratamiento de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (ii) un polipéptido 5 soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

Por último, en un sexto aspecto, la invención se refiere al uso de (a) una superficie sólida; y (b) un ligando de BCMA y TACI, en un método para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (ii) un polipéptido 5 soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
- (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
- (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

Definiciones

5 Para facilitar la comprensión de la presente descripción, a continuación, se explicará el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención. Se incluirán definiciones adicionales a lo largo de la descripción según sea necesario.

10 El término "allogénico", como se usa en el presente documento, debe interpretarse en el sentido de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son allogénicos entre sí cuando los genes de uno o más locus no son idénticos.

15 El término "autólogo", como se usa en el presente documento, debe entenderse como del mismo individuo. El término "población" de células es cualquier número de células superior a 1, pero preferentemente es al menos 1×10^3 células, al menos 1×10^4 células, al menos 1×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos 1×10^7 células, al menos 1×10^8 células o al menos 1×10^9 células. En realizaciones preferidas de la invención, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 % o al menos un 95 % de las células madre (% por número de células) de una población celular inicial serán células madre multipotentes no diferenciadas.

20 La expresión "enfermedad inmunitaria" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunitaria del sujeto. La expresión "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por una lesión celular, tisular y/u orgánica causada por una reacción inmunitaria del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes, de enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse con las células inmunomoduladoras de la invención incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, pénfigo ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis por enfermedad celíaca, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía de IgA, artritis juvenil, líquen plano, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 y o mediada por el sistema inmunitario, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de Sjögren, síndrome de Good pasture, síndrome de Stiff-Man, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiforme por dermatitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, síndrome antifosfolípido, enfermedades autoinmunitarias del sistema nervioso, fiebre mediterránea familiar, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, oftalmia simpática polisocitopinopatía, psoriasis, etc.

45 La expresión "enfermedad inflamatoria mediada por el sistema inmunitario" debe entenderse como cualquier enfermedad caracterizada por una inflamación crónica o aguda, resultante de, asociada con o desencadenada por, una desregulación de la respuesta inmunitaria normal, por ejemplo, la enfermedad de Crohn, diabetes mellitus de tipo 1, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Hashimoto, enfermedad del injerto contra el huésped, síndrome de Sjögren, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, colitis ulcerosa, anemia hemolítica autoinmunitaria, esterilidad, miastenia grave, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, trombopenia púrpura, síndrome de Guillain-Barre, alergia, asma, enfermedad atópica, arteriosclerosis, miocarditis, cardiomiopatía, nefritis glomerular, anemia hipoplásica y rechazo tras trasplante de órgano.

55 Para los fines de la invención descrita en el presente documento, los "trastornos inmunitarios" incluyen enfermedades autoinmunitarias y enfermedades mediadas inmunológicamente.

60 La expresión "enfermedad inflamatoria" se refiere a una afección en un sujeto caracterizada por inflamación, por ejemplo, inflamación crónica. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes, de trastornos inflamatorios incluyen, aunque sin limitación, enfermedad celíaca, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), asma, encefalitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), osteólisis inflamatoria, trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), vacíos inflamatorios (por ejemplo, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, arteritis temporal y granulomatoso linfomatoide), angioplastia vascular postraumática (por ejemplo, restenosis tras una angioplastia), espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, hepatitis crónica e inflamación crónica resultante de infecciones víricas crónicas o bacterianas.

65 El término "aislado" aplicado a una población celular se refiere a una población celular, aislada del cuerpo humano o animal, que está esencialmente libre de una o más poblaciones celulares que están asociadas con dicha población

celular *in vivo* o *in vitro*.

5 El término "MHC" (complejo de histocompatibilidad principal) se refiere a un subconjunto de genes que codifican proteínas presentadoras de antígenos de la superficie celular. En los seres humanos, estos genes se conocen como genes del antígeno leucocitario humano (HLA). En el presente documento, las abreviaturas MHC o HLA se usan indistintamente. El término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gatos, perro, rata o ratón) y un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

10 El término "inmunomodulador" se refiere a la inhibición o reducción de una o más actividades biológicas del sistema inmunitario que incluye, pero sin limitación, la regulación negativa de la respuesta inmunitaria y los estados inflamatorios, así como los cambios en el perfil de citocinas, la actividad citotóxica y la producción de anticuerpos. La expresión "inmunomodulador específico del antígeno" se refiere a la inhibición o reducción de una o más actividades biológicas del sistema inmunitario asociadas con un antígeno o antígenos específicos, incluyendo tanto aloantígenos como autoantígenos.

15 Como se usa en el presente documento, "negativo" o "-" como se usa con respecto a los marcadores de la superficie celular debe entenderse que, en una población celular, menos del 20 %, 10 %, preferentemente menos del 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o ninguna de las células expresa dicho marcador. La expresión de marcadores de superficie celular se puede determinar, por ejemplo, mediante citometría de flujo para un marcador de superficie celular específico usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema FACS de Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles en el mercado y protocolos convencionales conocidos en la técnica).

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre" debe entenderse como una célula que es capaz de dar lugar a múltiples tipos diferentes de células.

25 La expresión "célula madre mesenquimal" o "MSC" se entenderá como una célula madre derivada originalmente del mesénquima. La expresión se refiere a una célula que es capaz de diferenciarse en al menos dos o más de entre un osteoblasto, un condrocito, un adipocito o un miocito. Las MSC pueden aislarse de cualquier tipo de tejido. En general, las MSC se aislarán de la médula ósea, del tejido adiposo, del cordón umbilical o de la sangre periférica. Las MSC usadas en la invención pueden aislarse, en algunas realizaciones, de médula ósea (BM-MSC) o tejido adiposo (ASC). En un aspecto preferido de la invención, las MSC se obtienen a partir de lipoaspirados, que se obtienen a partir de tejido adiposo.

30 Como se usan en el presente documento, el término "multipotente" (conocido, como alternativa, como "pluripotente") se entenderá como una célula que es capaz de dar lugar a múltiples tipos de células de diferentes linajes.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión significativa" o sus términos equivalentes "positiva" y "+", cuando se usan con respecto a un marcador de superficie celular, debe entenderse que, en una población celular, más del 20 %, preferentemente más del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o incluso todas las células de las células expresan dicho marcador.

40 La expresión de marcadores de superficie celular se puede determinar, por ejemplo, mediante citometría de flujo para un marcador de superficie celular específico usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema FACS de Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles en el mercado y protocolos convencionales conocidos en la técnica) que muestre una señal para un marcador de superficie celular específico en citometría de flujo por encima de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema FACS de Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles en el mercado y protocolos convencionales conocidos en la técnica). La señal de fondo se define como la intensidad de la señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar cada marcador de superficie en el análisis FACS convencional. Para que un marcador se considere positivo, la señal específica observada es más potente que el 20 %, preferentemente más potente que el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 500 %, 1.000 %, 5.000 %, 10.000 % o más, de la intensidad de la señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema FACS de Beckman Coulter Epics XL usado con anticuerpos disponibles en el mercado y protocolos convencionales conocidos en la técnica).

45 Además, los anticuerpos monoclonales conocidos y disponibles en el mercado contra dichos marcadores de la superficie celular (por ejemplo, receptores celulares y proteínas transmembrana) pueden usarse para identificar células relevantes.

50 Como se usa en el presente documento, Los términos "tratar", y "tratamiento" cuando se usan directamente en referencia a un paciente o sujeto deben entenderse como la mejoría de uno o más síntomas asociados con un trastorno, incluyendo, entre otros, aunque sin limitación, un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad mediada inmunológicamente que incluye el rechazo de órganos y tejidos trasplantados, en el que dicha mejoría se debe a la administración de las células inmunomoduladoras de la invención, o una composición farmacéutica que las comprende, a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Como se usan en el presente documento, los términos "reparar" y "reparación", cuando se usan directamente en referencia a tejidos dañados, deben entenderse como la mejoría de dicho daño mediante mecanismos directos tales como la regeneración de tejidos dañados, así como a través de mecanismos indirectos, por ejemplo, reduciendo la inflamación, permitiendo así la formación de tejido.

5 Como se usa en el presente documento, el término "inductor", cuando se usa en referencia a un ligando, debe entenderse como un agente o agentes que producen el aumento de la producción de dicho ligando.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "terapia celular" debe entenderse como el trasplante de células humanas o animales para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno, tal como, por ejemplo, el reemplazo o la reparación de tejidos u órganos dañados, la modulación de las reacciones inmunitarias y la reducción de los síntomas inflamatorios.

15 Como se usa en el presente documento, el término BCMA se toma como un polipéptido que comprende una secuencia al menos un 85 % idéntica (preferentemente, al menos un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

20 Como se usa en el presente documento, el término TACI se toma como un polipéptido que comprende una secuencia al menos un 85 % idéntica (preferentemente, al menos un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.

25 La presente invención desvela que el uso de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor de los mismos mejora el cultivo de células madre multipotentes. Por consiguiente, los medios de cultivo de la invención pueden comprender un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor de los mismos, y la invención proporciona el uso de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor de los mismos para el cultivo de células madre multipotentes.

30 Un "ligando de BCMA y TACI" es un agente que se une a al menos una isoforma de BCMA y a al menos una isoforma de TACI. Se conocen varios métodos para determinar si una sustancia dada es un ligando y se podría usar junto con la presente invención.

En particular, se prefiere un agonista de BCMA y TACI. Un "agonista de BCMA y TACI" es un agente que se une a al menos una isoforma de BCMA y a al menos una isoforma de TACI, y desencadena una respuesta fisiológica.

35 Los ligandos de BCMA y TACI particularmente preferidos de acuerdo con la presente invención son BAFF y APRIL.

40 Como se usa en el presente documento, "BAFF" es un polipéptido que comprende una secuencia al menos un 85 % idéntica (preferentemente, al menos un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al aminoácido de BAFF. En realizaciones preferidas, el BAFF es un polipéptido soluble que comprende todo o una parte sustancial (por ejemplo, al menos el 85 %, 90 %, 95 % o más) del dominio de tipo TNF de BAFF.

45 Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de BAFF humana de longitud completa natural están disponibles con el número de acceso de GenBank™ Q9Y275 (SEQ ID NO: 1). BAFF de longitud completa es una proteína de membrana de tipo II que tiene dominios intracelulares, transmembrana y extracelulares. En la BAFF humana, estos dominios se componen de aproximadamente (por ejemplo, \pm 2 o 3 restos) de los aminoácidos 1-46, 47-67 y 68-285 de SEQ ID NO: 1, respectivamente. Existe una forma soluble natural de BAFF, en la que se produce una escisión proteolítica entre los aminoácidos R133 y A134 en la BAFF humana, dando lugar a una parte C-terminal biológicamente activa hidrosoluble de BAFF.

50 Las composiciones adecuadas para su uso en los métodos de la invención incluyen BAFF soluble. En general, dichas formas solubles de BAFF no comprenden los dominios transmembrana e intracelular. Dado que la BAFF soluble de origen natural no comprende una parte del dominio extracelular (es decir, los aminoácidos 74-133 de SEQ ID NO: 1), la BAFF soluble de la invención también puede excluir estas regiones.

55 En determinadas realizaciones, la BAFF soluble es un polipéptido que comprende todo o una parte sustancial del dominio similar a TNF de BAFF, por ejemplo, los aminoácidos 145-284 de SEQ ID NO: 1 (BAFF humana), o una secuencia al menos un 85 %, 90 % o 95 % idéntica al mismo.

60 En realizaciones ilustrativas no limitantes, BAFF soluble comprende los aminoácidos 134-285 de SEQ ID NO: 1, o sus truncamientos N- y/o C-terminales. Por ejemplo, el extremo N de BAFF soluble puede estar entre los restos 134-170 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, el extremo N de BAFF soluble puede extenderse hasta e incluir el aminoácido 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169 o 170; mientras que, independientemente, el extremo C está entre los restos 250-285 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, puede extenderse hasta e incluir el aminoácido 285, 284, 283, 282, 281, 280, 279, 278, 277, 276, 275, 274, 273, 272, 271, 270, 269, 268, 267, 266, 265, 264, 263, 262, 261, 260, 259, 258, 257, 256, 255, 254, 253, 252, 251, 250 de SEQ ID NO: 1. En una realización, BAFF soluble comprende los aminoácidos 136-285 de SEQ ID NO: 1.

Un inductor particularmente preferido de BAFF de acuerdo con la presente invención es el interferón gamma.

Como se usa en el presente documento, "APRIF" es un polipéptido que comprende una secuencia al menos un 85 % idéntica (preferentemente, al menos un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica) al dominio extracelular de APRIF.

5 En determinadas realizaciones, APRIF es un polipéptido que comprende todo o una parte sustancial (por ejemplo, al menos el 85 %, 90 %, 95 % o más) del dominio extracelular de APRIF.

10 Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de APRIL humano de longitud completa natural están disponibles con el número de acceso de GenBank™ 075888 (SEQ ID NO: 2). APRIL de longitud completa es una proteína de membrana de tipo II que tiene dominios intracelulares, transmembrana y extracelulares. En la APRIL humana, estos dominios se componen de aproximadamente (por ejemplo, ± 2 o 3 restos) de los aminoácidos 1-28, 29-49 y 50-250 de SEQ ID NO: 2, respectivamente. Existe una forma soluble natural de APRIL, en la que se produce una escisión entre los aminoácidos R104 y A105 en la APRIL humana, dando lugar a una parte C-terminal biológicamente activa soluble de APRIL.

15 Las composiciones adecuadas para su uso en los métodos de la invención incluyen APRIL soluble. En general, dichas formas solubles de APRIL no comprenden el dominio transmembrana. Dado que la APRIL soluble de origen natural no comprende una parte del dominio extracelular (es decir, los aminoácidos 49-104 de SEQ ID NO: 2), la APRIL soluble de la invención también puede excluir estas regiones.

20 En realizaciones ilustrativas no limitantes, APRIL soluble comprende los aminoácidos 105-250 de SEQ ID NO: 2, o sus truncamientos N- y/o C-terminales. Por ejemplo, el extremo N de APRIL soluble puede estar entre los restos 105-140 de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, el extremo N de APRIL soluble puede extenderse hasta e incluir el aminoácido 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 o 140; mientras que, independientemente, el extremo C está entre los restos 220-250 de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, puede extenderse hasta e incluir el aminoácido 285, 284, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249 o 250 de SEQ ID NO: 2. En una realización, APRIL soluble comprende los aminoácidos 107-250 de SEQ ID NO: 2.

30 Un inductor particularmente preferido de BAFF de acuerdo con la presente invención es el CXCL-12.

35 La composición que comprende BAFF o APRIL adecuada para su uso en los métodos de la invención incluye además sus derivados (también denominados en el presente documento "sustitutivos") en los que la secuencia de aminoácidos está mutada, parcialmente eliminada y/o contiene una o más inserciones, por lo que siempre que los cambios en la secuencia de tipo silvestre no afecten sustancialmente a la actividad biológica de la molécula con respecto a los receptores de BCMA y TACI.

40 La invención proporciona nuevos usos de medios y métodos de cultivo para células madre multipotentes, que proporcionan ventajas significativas frente a los medios y métodos de cultivo conocidos. La invención también proporciona composiciones relacionadas. Además, el presente documento también desvela medios de cultivo y complementos de medios de cultivo relacionados.

45 Breve descripción de las figuras

50 **Figura 1. Expresión de APRIL, BAFF y sus receptores en hASC.** (A) Se extrajo ARN y se transcribió de manera inversa a partir de hASC cultivada. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se purificaron de las capas leucocíticas, y se usaron como control positivo. La figura muestra el producto de PCR amplificado específico de cada gen (APRIL, BAFF, TACI, BCMA, BAFF-R) con β -actina como control y diluciones en serie de ADNc (1, 1:5, 1:25). Se realizaron tres ensayos independientes por diana y experimento. (B) La concentración de APRIL y BAFF en los sobrenadantes de hASC se cuantificó mediante ELISA (n = 6, día 6). Media \pm DT mostrada para tres experimentos independientes. (C) La expresión del receptor de TACI y BCMA se determinó mediante citometría de flujo. Los histogramas rellenos representan hASC teñidos con anticuerpos acoplados a fluorocromos de TACI y BCMA (controles de isotipo, histogramas vacíos). Los datos se analizaron usando el programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

55 **Figura 2. APRIL y BAFF mejoran la viabilidad y proliferación de hASC** (A): Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se cultivaron hASC ($3,5 \times 10^3$ células/pocillo) durante 6 días en placas de 96 pocillos con 100 ng/ml de APRIL o BAFF. La absorbancia (DO a 490 nm) se midió en un lector de placas ELISA (n = al menos tres experimentos). Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia de las células cultivadas sin estímulos (100 %). (B): Los histogramas muestran la proliferación celular medida mediante un ensayo colorimétrico de incorporación de BrdU. Se cultivaron hASC en placas p60 con 100 ng/ml de APRIL o BAFF; se añadió BrdU (20 μ M) durante los últimos tres días. En el día 6, se detectó la incorporación de BrdU mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-BrdU. Los números indican el porcentaje de células positivas para BrdU y, por lo tanto, que proliferan activamente.

Figura 3. Señalización mediada por APRIL y BAFF en hASC. Se estimularon hASC con 100 ng/ml de APRIL o BAFF (10, 30, 60, 120 min, 37 °C), se colocaron en hielo, se lavaron con PBS helado y se lisaron con tampón de lisis celular (Roche, Indianápolis, IN). Los extractos se cuantificaron por absorbancia, se resolvieron en SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia. Los anticuerpos usados fueron anti-fosfo-Akt (Ser473), -Akt, -fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y -ERK1/2 (BD Bioscience); los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-conejo bovina y anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante. (B): Los histogramas muestran la proliferación celular medida por la incorporación de BrdU como en (Fig. 2B), con la adición del inhibidor de ERK U0126 (2,5 µM; Sigma) o el inhibidor de PI3K LY294002 (10 µM; Calbiochem) al cultivo en los días 0 y 3. Los resultados representan uno de los tres experimentos independientes.

Figura 4. Modulación de APRIL y BAFF en hASC. Efecto inmunosupresor (A): se cultivaron células hASC con 100 ng/ml de APRIL (barra de color gris claro), BAFF (barra de color gris oscuro) o sin estímulo (barra blanca), y luego se estimularon con 1 µg/ml de LPS o poli I:C. La figura muestra la concentración de IL-6 e IL-8 en el medio después de 48 h, medida mediante el inmunoensayo de la matriz de perlas citométrica (CBA) (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se adquirieron usando un citómetro FACScalibur, y se analizaron con el software de matriz FCAP (BD Bioscience). (B): Ensayo de inmunosupresión: se cultivaron hASC alogénicas con PBL marcadas con CFSE activadas en una proporción de 1:25 (hASC: PBL) en presencia o ausencia de BAFF o APRIL (100 ng/ml). Tras 5 días, se recogieron las células, se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACScalibur (BD Bioscience) y se adquirieron para CFSE. Se muestra el porcentaje de células en proliferación (en relación con las PBL solas) en las últimas dos generaciones. Se representan la media y la desviación típica de los experimentos con 6 capas leucocíticas diferentes. Las capas leucocíticas fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Transfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid. Las PBL se aislaron mediante un gradiente de centrifugación de densidad usando Ficollplaque Plus (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala); (C): se cultivaron células hASC con IFN γ . Los sobrenadantes se recogieron cinco días después. La figura muestra la medición mediante ELISA de las concentraciones de APRIL y BAFF en el medio (R&D Systems para BAFF, Bender MedSystem para APRIL).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se puede usar para proporcionar poblaciones expandidas *ex vivo* de células madre, que se pueden usar para aplicaciones en terapia celular. Existe una gran necesidad en la técnica de un método de expansión eficaz para proporcionar la gran cantidad de células madre necesarias para la terapia celular. Una ventaja de las diversas realizaciones de la invención es que pueden usarse para cultivar células madre mesenquimales a una alta velocidad de proliferación, mientras se mantiene su fenotipo no diferenciado.

Los medios de cultivo desvelados en el presente documento comprenden, entre otros ingredientes, un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo.

Por consiguiente, la divulgación proporciona un medio de cultivo para expandir una población de células madre multipotentes, que comprende un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo.

La divulgación también proporciona un complemento de medio de cultivo que comprende un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo.

La divulgación también proporciona un recipiente herméticamente sellado que contiene un medio de cultivo o un complemento de medio de cultivo de la invención.

La divulgación también proporciona un método para preparar un medio de cultivo como se desvela en el presente documento, que comprende las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo al medio de cultivo.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un medio de cultivo de la divulgación para expandir una población de células madre mesenquimales.

La invención también proporciona una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la divulgación; y (b) células madre.

La invención también proporciona una composición que contiene: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la divulgación; y (b) una superficie sólida.

La invención también proporciona un método *ex vivo* para expandir una población de células madre multipotentes, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo de la invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo en la fabricación de un medicamento de terapia celular.

Por consiguiente, en una realización, la invención también proporciona un método de fabricación de un medicamento de terapia celular, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo de la invención; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas.

5 La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) células madre, para la fabricación de un medicamento de terapia celular.

10 La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) una superficie sólida, para la fabricación de un medicamento de terapia celular.

15 Dichos medicamentos son de uso en el tratamiento, la reparación, la profilaxis y/o la mejoría de tejidos dañados, o uno o más síntomas asociados con trastornos inflamatorios y/o inmunitarios, tales como, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y enfermedades mediadas inmunológicamente, incluyendo el rechazo de órganos y tejidos trasplantados. Un medicamento de terapia celular de la invención comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de células madre y un vehículo farmacéutico. Son particularmente preferidas las células madre de origen mesenquimal, lo más preferentemente, las células madre derivadas de tejido adiposo.

20 En la técnica, se conocen ejemplos de dosis y pautas posológicas para cada uno de estos tipos de células. Los vehículos farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica y son preferentemente aquellos aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de EE. UU. o de un gobierno estatal, o los enumerados en la Farmacopea estadounidense o europea, u otra farmacopea reconocida en general, para su uso en animales, más concretamente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de
25 agentes tamponadores del pH. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico o terapéutico preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración apropiada al sujeto. La formulación ha de ser adecuada para el modo de administración. En una realización preferida, los medicamentos son estériles y se encuentran en una forma adecuada para la administración a un sujeto, preferentemente, un sujeto animal, más preferentemente, un sujeto mamífero, y lo más preferentemente, un sujeto humano.

30 El medicamento de la invención puede estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas semisólidas y líquidas, tales como preparados liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas, soluciones inyectables e infusibles, etc., el medicamento es preferentemente inyectable.

35 Se prefiere que los medicamentos sean para tratar o reparar tejido dañado (preferentemente, tejido mesenquimal) y/o para el tratamiento, la modulación, la profilaxis y/o la mejoría de uno o más síntomas asociados con trastornos inflamatorios e/o inmunitarios. Por consiguiente, los métodos y las células de la invención son útiles en el tratamiento de cualquier trastorno caracterizado por uno o todos los síntomas mencionados. En el apartado de definiciones, se proporciona una lista no exhaustiva representativa de dichos trastornos. En particular, se prefiere un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario. Además, se prefiere un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus, artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII, incluyendo la enfermedad de Crohn y/o la colitis ulcerosa) y la esclerosis múltiple (EM).

40 La invención también proporciona el uso de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo para el cultivo de células madre multipotentes.

45 Los ingredientes específicos de los medios de cultivo, los complementos y las composiciones de la invención pueden variar de acuerdo con las necesidades y aplicaciones particulares. Asimismo, las etapas exactas de los métodos de la invención pueden variar según las necesidades y aplicaciones particulares. Los medios de cultivo, complementos, métodos, composiciones y usos de acuerdo con la presente invención pueden optimizarse mediante experimentación rutinaria. Por ejemplo, si un medio de cultivo, un complemento o una composición no proporciona el nivel deseado de expansión de células madre multipotentes, variables tales como la cantidad de cada ingrediente en el medio de cultivo o el complemento, las densidades de siembra, las condiciones de cultivo, los períodos de cultivo, etc. se pueden modificar en experimentos posteriores. La cantidad de cada uno de los ingredientes descritos en el presente documento se puede optimizar independientemente del resto de ingredientes mediante la optimización de rutina, o se pueden añadir o eliminar uno o más ingredientes. Se puede ensayar un medio de cultivo para determinar su capacidad para soportar la expansión de células madre multipotentes mediante el ensayo junto con o en lugar de un medio o
50 método de cultivo conocido.

55 Los medios de cultivo, complementos, métodos, composiciones y usos de la invención se describen con más detalle a continuación. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de cultivo celular, biología molecular y microbiología, que están dentro de la experiencia de los expertos en la materia.

Hay numerosos libros de texto disponibles que brindan orientación sobre los medios y métodos de cultivo de células de mamíferos, incluyendo los libros de texto dedicados a los medios y métodos de cultivo de células madre.

Medios de cultivo

5 El medio de cultivo para el uso de la invención comprende un ligando de BCMA y TACI y/o inductor del mismo. En un aspecto, el medio de cultivo de la invención comprende BAFF o un sustitutivo de BAFF. En un aspecto alternativo, el medio de cultivo de la invención comprende APRIL o un sustitutivo de APRIL. En un aspecto adicional, el medio de cultivo de la invención comprende APRIL y BAFF o sustitutivos de los mismos.

10 Los medios de cultivo para su uso en la invención pueden comprender dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, o doce o más diferentes ligandos de BCMA y TACI y/o inductor de los mismos.

15 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 mM de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo.

20 En algunas realizaciones, un medio de cultivo de la invención puede comprender entre aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 mM de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo. Por ejemplo, un medio de cultivo puede comprender entre aproximadamente 1 pg/ml y 1-10 µg/ml de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 700 ng/ml de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 650 µg/ml de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 µg/ml de un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 µg/ml de un ligando de BCMA y de TACI y/o inductor del mismo, o aproximadamente 100 µg/ml de un ligando de BCMA y de TACI y/o inductor del mismo. Por ejemplo, un medio de cultivo puede comprender entre aproximadamente 50 y aproximadamente 150 µg/ml.

25 El medio de cultivo normalmente contiene un gran número de ingredientes, que son necesarios para mantener las células cultivadas. Un medio de cultivo de la invención, por tanto, normalmente contendrá mucho otros ingredientes además del ligando de BCMA y TACI y/o el inductor del mismo. El experto en la materia puede formular fácilmente combinaciones adecuadas de ingredientes, teniendo en cuenta la siguiente divulgación. Un medio de cultivo de acuerdo con la invención, en general, será una solución nutritiva que comprenderá ingredientes de cultivo celular convencionales, tales como aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, una fuente de energía de carbono y un tampón, como se describe con mayor detalle a continuación.

30 Un medio de cultivo de acuerdo con el uso de la invención puede generarse mediante la modificación de un medio de cultivo celular existente. El experto en la materia entiende los tipos de medios de cultivo que podrían usarse para el cultivo de células madre multipotentes. Hay medios de cultivo celular potencialmente adecuados disponibles en el mercado, e incluyen los medios de Eagle modificados por Dulbecco (DMEM), medio mínimo esencial (MEM), medio mínimo esencial de Eagle, DMEM desactivado (KO-DMEM), medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), medio basal de Eagle (BME), DMEM/Ham's F 12, DMEM avanzado/Ham's F 12, medios de Dulbecco y medios esenciales mínimos (MEM) modificado por Iscove.

35 Muchos medios de cultivo celular ya contienen aminoácidos, sin embargo, algunos requieren complementos antes del cultivo de las células. Los aminoácidos que pueden estar presentes incluyen L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cisteína, L-cistina, ácido L-glutámico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina y combinaciones de los mismos.

40 En general, cada aminoácido, cuando está presente, está presente entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 1 g/l de medio (en general, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15 g/l), excepto para la L-glutamina, que está presente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 g/l (normalmente, de aproximadamente 0,1 a 0,75 g/l). Los aminoácidos pueden ser de origen sintético.

45 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender una o más vitaminas. El experto en la materia conoce los tipos y las cantidades apropiados de vitaminas para su uso en medios de cultivo de células madre. Las vitaminas que pueden estar presentes incluyen tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), pantotenato de calcio D (vitamina B5), piridoxal/piridoxamina/piridoxina (vitamina B6), ácido fólico (vitamina B9), cianocobalamina (vitamina B12), ácido ascórbico (vitamina C), calciferol (vitamina D2), DL-alfa tocoferol (vitamina E), biotina (vitamina H) y menadiona (vitamina K).

50 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender una o más sales inorgánicas. El experto en la materia conoce los tipos y las cantidades apropiados de sales inorgánicas para su uso en medios de cultivo de células madre. Las sales inorgánicas normalmente se incluyen en los medios de cultivo para ayudar a mantener el equilibrio osmótico de las células y para ayudar a regular el potencial de membrana. Las sales inorgánicas que pueden estar presentes incluyen sales de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio, cinc. Las sales normalmente se usan en

forma de cloruros, fosfatos, sulfatos, nitratos y bicarbonatos. Las sales específicas que pueden usarse incluyen CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaHCO_3 , NaCl , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

5 La osmolaridad del medio puede estar en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mOsm/kg, en el intervalo de aproximadamente 290 a aproximadamente 350 mOsm/kg, o en el intervalo de aproximadamente 280 a aproximadamente 310 mOsm/kg. La osmolaridad del medio puede ser inferior a aproximadamente 300 mOsm/kg (por ejemplo, aproximadamente 280 mOsm/kg).

10 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender una fuente de energía de carbono, en forma de uno o más azúcares. El experto en la materia conoce los tipos y las cantidades apropiados de azúcares para su uso en medios de cultivo de células madre. Los azúcares que pueden estar presentes incluyen glucosa, galactosa, maltosa y fructosa. El azúcar es preferentemente glucosa, en particular, D-glucosa (dextrosa). Una fuente de energía de carbono normalmente estará presente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 g/l.

15 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender un tampón. El experto puede seleccionar fácilmente un tampón adecuado. El tampón puede ser capaz de mantener el pH del medio de cultivo en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 durante las condiciones de cultivo normales, más preferentemente aproximadamente pH 7,0. Los tampones que pueden usarse incluyen carbonatos (por ejemplo, NaHCO_3), cloruros (por ejemplo, CaCl_2), sulfatos (por ejemplo, MgSO_4) y fosfatos (por ejemplo, NaH_2PO_4). En general, estos tampones se usan de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 mg/l. También se pueden usar otros tampones tales como el ácido *N*-[2-hidroxietil]-piperazin-*N'*-[2-etanosil-fónico] (HEPES) y ácido 3-[*N*-morfolin]-propanosulfónico (MOPS), normalmente de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 mg/l.

25 Un medio de cultivo de la invención puede contener suero. El suero contiene factores y componentes celulares y no celulares que pueden ser necesarios para la viabilidad y la expansión. Se puede usar el suero obtenido de cualquier fuente apropiada, incluyendo suero bovino fetal (FBS), suero bovino (BS), suero de ternera (CS), suero de ternera fetal (FCS), suero de ternera neonatal (NCS), suero de cabra (GS), suero de caballo (HS), suero porcino, suero de oveja, suero de conejo, suero de rata (RS), etc. También está dentro del alcance de la invención que si dicha MSC es de origen humano, el medio de cultivo celular se complementa con un suero humano, preferentemente de origen autólogo. Se entiende que los sueros pueden inactivarse por calor a 55-65 °C si se considera necesario para inactivar los componentes de la cascada del complemento. Cuando se usa un sustitutivo del suero, se puede usar entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 25 % en volumen del medio, de acuerdo con las técnicas convencionales.

35 En otras divulgaciones, un medio de cultivo de la invención puede contener un sustitutivo del suero. Hay diversas formulaciones diferentes de sustitución del suero disponibles en el mercado, y son conocidas por los expertos en la materia, tales como, pero sin limitación, albúmina sérica, transferrina sérica, selenio y proteínas recombinantes incluyendo, pero sin limitación, insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). Cuando se usa un sustitutivo del suero, se puede usar entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 25 % en volumen del medio, de acuerdo con las técnicas convencionales.

45 En otras divulgaciones, un medio de cultivo para su uso en la invención puede estar libre de suero y/o libre del sustitutivo del suero. Un medio sin suero es aquel que no contiene suero animal de ningún tipo. Se pueden preferir medios sin suero para evitar la posible xenocontaminación de las células madre. Un medio sin sustitutivo del suero es aquel que no se ha complementado con ninguna fórmula comercial sustitutiva del suero.

50 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender una o más hormonas, e incluye, aunque sin limitación, D-aldosterona, dietilestilbestrol (DES), dexametasona, b-estradiol, hidrocortisona, insulina, prolactina, progesterona, Somatostatina/hormona de crecimiento humana (HGH), etc.

55 Un medio de cultivo para su uso en la invención puede comprender una o más citocinas. El experto en la materia conoce los tipos y las cantidades apropiados de citocinas para su uso en medios de cultivo de células madre. Las citocinas que pueden estar presentes incluyen citocinas de acción temprana y de acción tardía, y pueden seleccionarse del grupo que consiste en factor de células madre, ligando FLT3, interleucina-6, trombopoyetina, interleucina-3, factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

60 Un medio de cultivo puede comprender además rojo de fenol como indicador del pH, para permitir el fácil control del estado del medio (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/litro).

65 Los medios de cultivo preferidos se describen en los ejemplos del presente documento. En una divulgación, un medio de cultivo de la invención comprende, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con antibióticos (por ejemplo, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) o sin antibióticos y glutamina 2 mM, y complementado con suero bovino fetal (FBS) al 2-20 %, y 100 µg/ml de BAFF y/o APRIL.

Un medio de cultivo de la divulgación normalmente se formulará en agua destilada desionizada. Un medio de cultivo de la invención normalmente se esterilizará antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, por luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. El medio de cultivo puede congelarse (por ejemplo, a -20 °C o -80 °C) para su almacenamiento o transporte.

5 Los agentes antimicrobianos también se usan normalmente en cultivos celulares para mitigar la contaminación bacteriana, micoplásmica y micótica. El medio puede contener uno o más agentes antimicrobianos o antibióticos para prevenir la contaminación. Por lo general, los antibióticos o compuestos antimicóticos usados son mezclas de penicilina/estreptomicina, pero también pueden incluir, pero sin limitación, anfotericina (Fungizone(R)), ampicilina, gentamicina, bleomicina, higromacina, kanamicina, mitomicina, etc.

10 El medio puede tener un contenido de endotoxina inferior a 0,1 unidades de endotoxina por ml, o puede tener un contenido de endotoxina inferior a 0,05 unidades de endotoxina por ml. Los métodos para determinar el contenido de endotoxinas de los medios de cultivo son conocidos en la técnica.

15 El medio de cultivo puede ser acondicionado por la adición de células que expresen y secreten constitutivamente un ligando de BCMA o TACI tal como BAFF o APRIL o sus sustitutos. El medio acondicionado se produce mediante el cultivo de una población de dichas células en un medio de cultivo durante un tiempo suficiente para acondicionar el medio, y luego se recoge el medio acondicionado. Cuando se usa un medio acondicionado, el medio puede estar
20 acondicionado sobre células de mamíferos, por ejemplo, células de ratón o células humanas. Se pueden usar diversos tipos diferentes de células de mamífero para producir un medio acondicionado adecuado para el cultivo de células madre multipotentes.

25 Un medio de cultivo puede ser una formulación x1 o una formulación concentrada, por ejemplo, una formulación de medio concentrada de x2 a x250. En una formulación x1, cada ingrediente del medio está a la concentración prevista para el cultivo celular. En una formulación concentrada, uno o más de los ingredientes están presentes a una concentración más alta que la prevista para el cultivo celular. Los medios de cultivo concentrados son bien conocidos en la técnica. Los medios de cultivo se pueden concentrar usando métodos conocidos, por ejemplo, la precipitación salina o filtración selectiva. Un medio concentrado se puede diluir para su uso con agua (preferentemente, desionizada y destilada) o cualquier solución apropiada, por ejemplo, una solución salina acuosa, un tampón acuoso o un medio de cultivo.

30 Un medio de cultivo como el desvelado en el presente documento puede ser capaz de expandir una población de células madre en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo para al menos 2 pasadas en condiciones apropiadas. Se considera que las células madre se encuentran en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo si presentan ciertas características como las descritas con más detalle en otra parte del presente documento. El experto en la materia puede seleccionar las condiciones apropiadas de entre las usadas normalmente para el cultivo de células madre multipotentes. Preferentemente, un medio de cultivo es capaz de expandir una población de células madre en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo durante al menos 3, al menos 4,
35 al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 pasadas en condiciones apropiadas. Un medio de cultivo puede ser capaz de expandir una población de células madre multipotentes en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo durante más de 3 pasadas, más de 4 pasadas, más de 5 pasadas, más de 10 pasadas, más de 15 pasadas, más de 20 pasadas, más de 25 pasadas, más de 30 pasadas, más de 40 pasadas,
40 más de 50 pasadas o más de 100 pasadas. Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos de la invención, las células madre se cultivan en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo durante al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 pasadas en condiciones apropiadas.

45 Un medio de cultivo como el desvelado en el presente documento puede ser capaz de expandir al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 estirpes de células madre multipotentes diferentes (por ejemplo, diferentes estirpes de ASC humanas) en un estado multipotente, no diferenciado y proliferativo para múltiples pasadas en condiciones apropiadas.

50 Como se observa en otra parte en el presente documento, la divulgación también proporciona un recipiente sellado herméticamente que contiene un medio de cultivo de la invención. Los recipientes sellados herméticamente se pueden preferir para el transporte o almacenamiento de los medios de cultivo, para prevenir la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como un biorreactor, un matraz, una placa, un bote, un tarro, un vial o una bolsa.

55 Como se observa en otra parte en el presente documento, la divulgación también proporciona un método para preparar un medio de cultivo, que comprende las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo al medio de cultivo. Se contemplan varios métodos diferentes para preparar medios de cultivo, dependiendo de los ingredientes específicos que se incluirán en el medio de cultivo. Por ejemplo, un método para preparar un medio de cultivo puede comprender las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir BAFF

o APRIL al medio de cultivo. En una realización, un método para preparar un medio de cultivo puede comprender las etapas de: (a) obtener un medio de cultivo; y (b) añadir BAFF y APRIL al medio de cultivo.

Métodos de cultivo celular y usos de los medios de cultivo

5 Los medios de cultivo de la invención se pueden usar para expandir una población de células madre multipotentes. Por consiguiente, la invención proporciona el uso de cualquier medio de cultivo desvelado en el presente documento para expandir una población de células madre multipotentes.

10 La invención también proporciona un método *ex vivo* para expandir una población de células madre multipotentes, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células madre en condiciones apropiadas.

15 Un método para "expandir" una población de células es aquel que implica aumentar el número de células madre de una población inicial para generar una población expandida, mientras se mantiene la pluripotencia y sin diferenciación significativa, es decir, aquel que implica el crecimiento y la división de las células madre, pero no su diferenciación.

20 La invención también proporciona un método de fabricación de una de terapia celular, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo de la invención; (c) poner en contacto la población de células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas.

25 Los métodos de la invención pueden comprender cultivar las células en contacto con una superficie sólida como se describe en otra parte del presente documento. Por ejemplo, la invención proporciona un método que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células en condiciones apropiadas y en contacto con una superficie sólida. La invención también proporciona el uso de un medio de cultivo como el desvelado en el presente documento y una superficie sólida para expandir una población de células madre multipotentes. Las células madre multipotentes pueden adherirse, unirse o sembrarse en dicho soporte. Por lo general, las células se siembran en placas a una densidad deseada, tal como de aproximadamente 100 células/cm² a aproximadamente 100.000 células/cm² (tal como de aproximadamente 500 células/cm² a aproximadamente 50.000 células/cm², o más particularmente, de aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 20.000 células/cm²). Si se siembran a densidades inferiores (por ejemplo, a aproximadamente 300 células/cm²), las células se pueden aislar de forma clónica más fácilmente. Por ejemplo, después de unos días, las células sembradas a dichas densidades proliferarán en una población homogénea. En una realización particular, la densidad celular está entre 2.000-10.000 células/cm².

35 Los métodos de la invención pueden comprender una etapa de pasar las células madre a un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento. Por ejemplo, la invención proporciona un método que comprende: (a) proporcionar una población de células madre multipotentes; (b) proporcionar un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento; (c) poner en contacto las células madre con el medio de cultivo; (d) cultivar las células en condiciones apropiadas; (e) pasar las células a un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento; y (f) seguir cultivando las células en condiciones apropiadas.

45 Se apreciará que las etapas de los métodos desvelados en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado o al mismo tiempo, según corresponda, y no es necesario que se realicen en el orden en que se enumeran. Por ejemplo, en el método anterior, la etapa de proporcionar una población de células madre multipotentes se puede realizar antes, después o al mismo tiempo que la etapa de proporcionar un medio de cultivo.

50 Tras alcanzar la confluencia celular deseada, las células pueden expandirse por medio de pasadas consecutivas. Las células pueden pasarse en los métodos de la invención usando métodos conocidos, por ejemplo, incubando las células con tripsina y EDTA durante entre 5 segundos y 15 minutos a 37 °C. Se puede usar un sustitutivo de la tripsina (por ejemplo, TrypLE de Invitrogen), si se desea. La colagenasa, la dispasa, la acutasa u otros reactivos conocidos también se pueden usar para pasar las células. La pasada normalmente se requiere cada 2-8 días, tal como cada 4-7 días, dependiendo de la densidad inicial de la siembra. En algunas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la invención no comprenden ninguna etapa de selección manual de células no diferenciadas cuando las células se pasan. En algunas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la invención comprenden las pasadas automatizadas de las células madre, es decir, sin manipulación por un trabajador de laboratorio. El ambiente usado para cultivar las células madre puede ser estéril, así como la temperatura y el pH estables.

60 Los métodos y usos de la invención pueden implicar cualquier medio de cultivo o complemento según lo descrito en el presente documento. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden ser métodos sin suero y/o sin sustitutivo del suero. En algunas realizaciones, los métodos de la invención se pueden usar para cultivar células en ausencia del contacto con una capa de células alimentadoras.

65

Se prefiere que dicha población de células madre sea de origen adulto, y se prefiere además que dichas células sean una población de células madre mesenquimales, lo más preferentemente, las células madre derivadas de tejido adiposo.

- 5 Las condiciones para el cultivo de células madre son conocidas por los expertos en la materia. Sin embargo, se prefiere particularmente que el cultivo se lleve a cabo en presencia de un soporte sólido adecuado para la adherencia de las células madre mesenquimales.

- 10 Dicho método de fabricación puede comprender opcionalmente además las etapas de: (e) pasar las células a un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento; y (f) seguir cultivando las células en condiciones apropiadas.

Por lo tanto, en una realización particular, las células se cultivan sin diferenciación en una superficie sólida, generalmente, hecha de un material plástico, tal como placas de Petri o matraces de cultivo celular, en presencia de un medio de cultivo celular adecuado [por ejemplo, DMEM, normalmente complementado con 5-15 % (por ejemplo, 10 %) de un suero adecuado, tal como suero bovino fetal o suero humano y un ligando de BCMA o TACI, tal como BAFF o APRIL o sustitutivos del mismo, y se incuban en condiciones que permiten que las células se adhieran a la superficie sólida y proliferen. Después de la incubación, las células se lavan para eliminar las células no adheridas y los fragmentos celulares. Las células se mantienen en cultivo en el mismo medio y en las mismas condiciones hasta que alcanzan la confluencia adecuada, normalmente, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 % o aproximadamente el 90 % de la confluencia celular, con el reemplazo del medio de cultivo celular cuando sea necesario. Tras alcanzar la confluencia celular deseada, las células pueden expandirse por medio de pasadas consecutivas usando un agente de desprendimiento tal como la tripsina y sembrando en una nueva superficie de cultivo celular a una densidad celular apropiada (en general, 2.000-10.000 células/cm²). Por lo tanto, las células pasan luego al menos dos veces en dicho medio sin diferenciarse, mientras que siguen conservando su fenotipo de desarrollo, y más preferentemente, las células pueden pasarse al menos 10 veces (por ejemplo, al menos 15 veces o incluso al menos 20 veces) sin perder el fenotipo de desarrollo. Por lo general, las células se siembran en placas a una densidad deseada, tal como de aproximadamente 100 células/cm² a aproximadamente 100.000 células/cm² (tal como de aproximadamente 500 células/cm² a aproximadamente 50.000 células/cm², o más particularmente, de aproximadamente 1.000 células/cm² a aproximadamente 20.000 células/cm²). Si se siembran a densidades inferiores (por ejemplo, a aproximadamente 300 células/cm²), las células se pueden aislar de forma clónica más fácilmente. Por ejemplo, después de unos días, las células sembradas a dichas densidades proliferarán en una población homogénea. En una realización particular, la densidad celular está entre 2.000-10.000 células/cm².

Las células que permanecen adheridas a la superficie sólida después de dicho tratamiento que comprende al menos dos pasadas se seleccionan, y el fenotipo de interés se analiza mediante métodos convencionales para confirmar la identidad de la ASC como se mencionará más adelante. Las células que permanecen adheridas a la superficie sólida después la primera pasada son de origen heterogéneo; por lo tanto, dichas células deben someterse a al menos otra pasada. Como resultado del método anterior, se obtiene una población celular homogénea que tiene el fenotipo de interés. La adhesión de las células a la superficie sólida después de al menos dos pasadas constituye una realización preferida de la invención para seleccionar la ASC. La confirmación del fenotipo de interés puede llevarse a cabo usando medios convencionales.

Preferentemente, dicha expansión se lleva a cabo mediante la duplicación o triplicación de dicha población al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 veces. En una realización adicional, dicha expansión se lleva a cabo en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 pasadas.

Los marcadores de la superficie celular pueden identificarse mediante cualquier técnica convencional adecuada, generalmente, basada en una selección positiva/negativa; por ejemplo, se pueden usar anticuerpos monoclonales contra marcadores de la superficie celular, cuya presencia/ausencia en las células se debe confirmar; aunque también se pueden usar otras técnicas. Por lo tanto, en una realización particular, se usan anticuerpos monoclonales contra uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o, preferentemente, todos de entre CD11b, CD11c, CD14, CD45, HLAII, CD31, CD34 y CD133 para confirmar la ausencia de dichos marcadores en las células seleccionadas; y se usan anticuerpos monoclonales contra uno, dos, tres, cuatro, de entre o preferentemente todos de entre CD9, CD44, CD54, CD90 y CD105 para confirmar la presencia de los mismos o niveles de expresión detectables de, al menos uno, y preferentemente todos, de entre dichos marcadores. Dichos anticuerpos monoclonales son conocidos, están disponibles en el mercado o pueden ser obtenidos por un experto en la materia mediante métodos convencionales.

La actividadIDO inducible por IFN- γ en las células seleccionadas puede determinarse mediante cualquier ensayo convencional adecuado. Por ejemplo, las células seleccionadas pueden estimularse con IFN- γ y analizarse para determinar la expresión deIDO; luego se puede realizar un análisis de transferencia Western para la expresión de la proteínaIDO, y se puede medir la actividad de la enzimaIDO tras la estimulación con IFN- γ de las células seleccionadas mediante la conversión de triptófano en quinurenina, por ejemplo, a través de un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la determinación fotométrica de la concentración de quinurenina en el sobrenadante como la lectura. Dado que laASC expresaIDO en ciertas condiciones, se puede usar cualquier técnica adecuada que permita la detección de la actividadIDO tras la estimulación con IFN- γ para seleccionar laASC.

La cantidad de IDO producida depende del número de células por centímetro cuadrado, que está preferentemente a un nivel de 5.000 células/cm² o superior, pero sin limitarse a esta concentración, y la concentración de IFN-gamma, que idealmente es de 3 ng/ml o superior, pero sin limitarse a esta concentración. La actividad IDO producida en las condiciones descritas generará una producción detectable de quinurenina en el intervalo de micromolar tras 24 horas o más.

La capacidad de las células seleccionadas para diferenciarse en al menos dos linajes celulares puede ensayarse mediante métodos convencionales como se conoce en la técnica.

ASC se puede expandir de forma clónica, si se desea, usando un método adecuado para clonar poblaciones de células. Por ejemplo, una población de células proliferadas se puede recoger físicamente y sembrar en una superficie separada (o en el pocillo de una placa de múltiples pocillos). Como alternativa, las células pueden subclonarse en una placa de múltiples pocillos en una proporción estadística que facilite la colocación de una sola célula en cada pocillo (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 célula/pocillo o incluso de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,5 células/pocillo, tal como 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse sembrándolas en placas de baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislándolas de otras células usando dispositivos tales como los anillos de clonación. La producción de una población clónica puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse hasta un punto adecuado cuando se pueda evaluar su fenotipo de desarrollo.

Se ha demostrado que la expansión *ex vivo* de la ASC sin inducir la diferenciación se puede lograr durante períodos de tiempo prolongados, por ejemplo, usando lotes especialmente seleccionados de suero adecuado (tal como suero fetal bovino o suero humano). Los métodos para medir la viabilidad y el rendimiento son conocidos en la técnica (por ejemplo, exclusión de azul de tripano).

Cualquiera de las etapas y los procedimientos para aislar las células de la población celular de la invención se pueden realizar manualmente, si se desea. Como alternativa, el proceso de aislamiento de dichas células puede facilitarse y/o automatizarse a través de uno o más dispositivos adecuados, cuyos ejemplos son conocidos en la técnica.

La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) células madre para la fabricación de un medicamento para terapia celular.

La invención también proporciona el uso de una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) una superficie sólida para fabricar un medicamento para terapia celular.

Los métodos de la invención pueden realizarse usando cualquier recipiente de cultivo celular adecuado como soporte. En la técnica, se conocen recipientes de cultivo celular de diversas formas y tamaños (por ejemplo, matraces, placas de un solo pocillo o de múltiples pocillos, platos de un solo pocillo o de múltiples pocillos, botes, frascos, viales, bolsas, biorreactores) y construidos con diversos materiales diferentes (por ejemplo, plástico, vidrio). El experto puede seleccionar fácilmente un recipiente de cultivo celular adecuado.

Complementos de medios de cultivo

También se desvela en el presente documento un complemento de medio de cultivo que puede usarse para producir un medio de cultivo como se desvela en el presente documento. Un "complemento de medio de cultivo" es una mezcla de ingredientes que no son compatibles con las células madre multipotentes, pero que permiten o mejoran el cultivo de células madre multipotentes cuando se combinan con otros ingredientes de cultivos celulares. Por lo tanto, el complemento puede usarse para producir un medio de cultivo celular funcional de la invención combinándolo con otros ingredientes de cultivo celular para producir una formulación de medio apropiada. El uso de complementos de medios de cultivo es bien conocido en la técnica. La divulgación proporciona un complemento de medio de cultivo que comprende un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo. El complemento puede contener cualquier ligando desvelado en el presente documento. El complemento también puede contener uno o más ingredientes de cultivo celular adicionales según lo desvelado en el presente documento, por ejemplo, uno o más ingredientes de cultivo celular seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, fuentes de energía de carbono y tampones.

Un complemento de medio de cultivo puede ser un complemento líquido concentrado (por ejemplo, un complemento líquido concentrado x2 a x250) o puede ser un complemento seco. Tanto los complementos líquidos como los secos son bien conocidos en la técnica. Un complemento puede estar liofilizado.

Un complemento para su uso en la invención normalmente se esterilizará antes de su uso para evitar la contaminación, por ejemplo, por luz ultravioleta, calentamiento, irradiación o filtración. Un complemento de medio de cultivo puede congelarse (por ejemplo, a -20 °C o -80 °C) para su almacenamiento o transporte.

Como se observa en otra parte en el presente documento, la divulgación también proporciona un recipiente sellado herméticamente que contiene un complemento de medio de cultivo de la invención. Los recipientes sellados

herméticamente se pueden preferir para el transporte o almacenamiento de los complementos de medios de cultivo desvelados en el presente documento, para prevenir la contaminación. El recipiente puede ser cualquier recipiente adecuado, tal como un biorreactor, un matraz, una placa, un bote, un tarro, un vial o una bolsa.

5 Composiciones y sistemas de cultivo celular

Los medios de cultivo celular y los complementos de cultivo celular desvelados en el presente documento pueden usarse para expandir una población de células madre multipotentes. Por consiguiente, la invención proporciona composiciones que surgen durante el uso de los medios de cultivo celular y los complementos de cultivo celular de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) células madre multipotentes.

Las composiciones de la invención pueden ser composiciones libres de células alimentadoras. Se considera convencionalmente que una composición está libre de células alimentadoras si las células madre multipotentes de la composición se han cultivado durante al menos una pasada en ausencia de una capa de células alimentadoras. Una composición libre de células alimentadoras de la invención normalmente contendrá menos del aproximadamente 5 %, menos del aproximadamente 4 %, menos del aproximadamente 3 %, menos del aproximadamente 2 % o menos del aproximadamente 1 % de células alimentadoras (expresado como un % del número total de células de la composición).

Se puede usar una superficie sólida para proporcionar una función de apoyo para el cultivo de células madre adherentes (por ejemplo, pero sin limitación, células madre mesenquimales). Por lo tanto, la invención también proporciona una composición que contiene: (a) un medio de cultivo de acuerdo con la invención; y (b) una superficie sólida. Estas composiciones pueden comprender además células madre multipotentes.

Se ha usado una variedad de sustancias como superficies para el cultivo de células madre adherentes, y un experto puede seleccionar fácilmente un material apropiado. Preferentemente, la superficie sólida comprende plástico, pero puede comprender, como alternativa, matriz extracelular de vidrio. La superficie puede ser plana, tubular o en forma de armazón, perla o fibra.

La invención también proporciona el uso de (a) una superficie sólida; y (b) un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, para expandir una población de células madre multipotentes. Por ejemplo, la invención proporciona el uso de BAFF y/o APRIL para expandir una población de células madre multipotentes. En un aspecto, la invención proporciona el uso de BAFF o un sustitutivo de BAFF para expandir una población de células madre multipotentes. En un aspecto alternativo, la invención proporciona el uso de APRIL o un sustitutivo de APRIL para expandir una población de células madre multipotentes. En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de APRIL y BAFF o un sustitutivo de los mismos para expandir una población de células madre multipotentes.

La invención también proporciona una composición o un recipiente de cultivo celular que comprende: (a) una superficie sólida; y (b) un ligando de BCMA y TACI y/o un inductor del mismo, para expandir una población de células madre multipotentes. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una composición o un recipiente de cultivo celular que comprende BAFF o un sustitutivo de BAFF para expandir una población de células madre multipotentes. En un aspecto alternativo, la invención proporciona una composición o un recipiente de cultivo celular que comprende APRIL o un sustitutivo de APRIL para expandir una población de células madre multipotentes. En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición o un recipiente de cultivo celular que comprende APRIL y BAFF o un sustitutivo de los mismos para expandir una población de células madre multipotentes.

Las composiciones de la invención pueden comprender suero, o pueden estar libres de suero y/o libres de sustitutivo del suero, tal como se describe en otras partes del presente documento.

La invención también proporciona una composición o un recipiente de cultivo celular que comprende: (a) una superficie sólida; y (b) un medio de cultivo de la presente invención que se ha complementado con el complemento B27 y el complemento N2.

55 Células madre multipotentes

Los medios de cultivo y los métodos desvelados en el presente documento son útiles para expandir una población de células madre multipotentes, mientras se mantiene la pluripotencia de las células y sin la problemática diferenciación de las células.

Las células madre "multipotentes" son aquellas que tienen el potencial de diferenciarse en células de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) en condiciones apropiadas.

Las células madre multipotentes no son totipotentes, es decir, no pueden formar un organismo completo, tal como un feto. Las células madre multipotentes para su uso en la invención pueden obtenerse usando métodos bien conocidos (véase más adelante). Se prevé que se puedan usar diversos tipos de células madre multipotentes junto con la invención, bien obtenidas de tejido embrionario, fetal o adulto, pero preferentemente derivadas de fuentes de tejido

adulto.

Los medios de cultivo desvelados en el presente documento pueden usarse para cultivar células madre de mamíferos, en particular, células madre adultas humanas. Las células madre adultas humanas que pueden usarse junto con la invención son preferentemente células madre mesenquimales. También se pueden usar células madre de ratón o de primate. En realizaciones preferidas, las células madre son células madre derivadas de tejido adiposo humano (ASC).

En resumen, las ASC se pueden obtener por medios convencionales a partir de cualquier fuente adecuada de tejido conjuntivo de cualquier animal adecuado como se ha analizado anteriormente. Por lo general, las células adiposas humanas se obtienen de donantes vivos, usando protocolos bien reconocidos tales como la lipectomía quirúrgica o por succión. De hecho, como los procedimientos de liposucción son tan comunes, El efluente de la liposucción es una fuente particularmente preferida de la que se pueden obtener ASC. Por lo tanto, en una realización particular, las ASC son de la fracción estromal del tejido adiposo humano obtenido por liposucción.

El tejido, preferentemente, se lava antes de ser procesado para separar las ASC del resto del material. En un protocolo comúnmente usado, la muestra de tejido se lava con una solución salina fisiológicamente compatible (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS)), y luego se agita vigorosamente y se deja que se asiente, una etapa que elimina la materia suelta (por ejemplo, el tejido dañado, la sangre, los eritrocitos, etc.) del tejido. Por lo tanto, las etapas de lavado y sedimentación, en general, se repiten hasta que el sobrenadante está relativamente libre de residuos. En general, las células restantes estarán presentes en grupos de varios tamaños, y el protocolo continúa usando etapas calibradas para degradar la estructura general y reducir al mínimo el daño en las propias células. Un método para lograr este fin es tratar los bultos de las células lavadas con una enzima que debilite o destruya los enlaces entre las células (por ejemplo, colagenasa, dispasa, tripsina, etc.). La cantidad y la duración de dicho tratamiento enzimático variarán, dependiendo de las condiciones empleadas, pero el uso de dichas enzimas es generalmente conocido en la técnica. Como alternativa, o junto con dicho tratamiento enzimático, los grupos de células pueden degradarse usando otros tratamientos, tales como agitación mecánica, energía sónica, energía térmica, etc. Si la degradación se logra mediante métodos enzimáticos, es deseable neutralizar la enzima tras un período adecuado, para reducir al mínimo los efectos nocivos sobre las células.

La etapa de degradación normalmente produce una pasta o suspensión de células agregadas y una fracción fluida que contiene células estromales generalmente libres (por ejemplo, glóbulos rojos, en células de músculo liso, células endoteliales, células de fibroblastos y células madre). La siguiente etapa del proceso de separación es separar las células agregadas de la ASC. Esto se puede lograr mediante centrifugación, lo que obliga a las células a formar un sedimento cubierto por un sobrenadante. El sobrenadante se puede desechar y el sedimento se puede suspender en un fluido fisiológicamente compatible. Por otra parte, las células suspendidas suelen incluir eritrocitos, y en la mayoría de los protocolos, es deseable lisarlos. Los métodos para lisar selectivamente eritrocitos son conocidos en la técnica, y se pueden emplear cualquier protocolo adecuado (por ejemplo, incubación en un medio hipertónico o hipotónico, mediante lisis con cloruro de amonio, etc.). Por supuesto, si los eritrocitos se lisan, las células restantes deben separarse del lisado, por ejemplo, mediante filtración, sedimentación o fraccionamiento de densidad.

Independientemente de si los eritrocitos se lisan, las células suspendidas pueden lavarse, volverse a centrifugar y volverse a suspender una o más veces para lograr una mayor pureza. Como alternativa, las células se pueden separar en función del perfil del marcador de la superficie celular o en función del tamaño de la célula y de la granularidad.

Tras el aislamiento final y la resuspensión, las células pueden cultivarse y, si se desea, analizarse su número y viabilidad para evaluar el rendimiento. Preferentemente, las células se cultivarán sin diferenciación, sobre una superficie sólida, usando un medio de cultivo celular adecuado, a las densidades celulares y condiciones de cultivo apropiadas.

Un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento se puede usar para cultivar células madre mesenquimales, en particular, las células madre derivadas de tejido adiposo.

Un medio de cultivo según lo desvelado en el presente documento también se puede usar para cultivar células madre multipotentes modificadas genéticamente. Las células modificadas genéticamente incluyen aquellas que han sido modificadas de forma transitoria o estable mediante transformación, transfección, transducción, etc.

Los medios de cultivo desvelados en el presente documento también se pueden usar para cultivar células que se han inducido o transformado para formar células con propiedades similares a las células madre. Estas células madre multipotentes pueden ser células modificadas genéticamente, tales como las células "madre multipotentes inducidas" (iPS) de ratón o de ser humano.

Cuando un medio de cultivo para su uso en la invención se usa para expandir una población de células madre multipotentes, el número total de células madre multipotentes no diferenciadas de la población preferentemente aumentará al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces, entre el momento en que se aplica un medio a una población celular inicial y el fin del período del cultivo. Se apreciará que las células pueden

pasarse una o más veces durante el período de cultivo, tras lo que las células pueden cultivarse en diferentes recipientes de cultivo celular o las células pueden desecharse. Si las células se cultivan en diferentes recipientes de cultivo celular tras la pasada, o si las células se desechan durante la pasada, esto se puede tener en cuenta al calcular la diferencia de veces en los números de células obtenidos durante un período de cultivo conocido.

5 En realizaciones preferidas de la invención, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 % o al menos un 95 % de las células madre (% por número de células) en una población expandida (por ejemplo, la población tras la expansión de la población inicial usando un medio de cultivo o un método según lo desvelado en el presente documento) serán no diferenciadas, multipotentes y proliferativas.

Los métodos para identificar células madre no diferenciadas, multipotentes y proliferativas, y para identificar el % de dichas células en una población, son conocidos, y los métodos adecuados para el uso con la presente invención pueden ser seleccionados por el experto en la materia dependiendo del tipo de célula madre que se use.

15 Las células madre multipotentes se pueden identificar por su capacidad para diferenciarse en células de las tres capas germinales, por ejemplo, determinando la capacidad de las células para diferenciarse en células que presenten una expresión detectable de marcadores específicos para las tres capas germinales.

20 Las referencias en singular (por ejemplo, a "una célula" y referencias equivalentes) abarcan el plural (por ejemplo, "células") a menos que el contexto requiera lo contrario.

Varios aspectos y realizaciones de la invención se describirán ahora con más detalle a modo de ejemplo, con referencia a medios y métodos de cultivo específicos. Se apreciará que la modificación de los detalles puede realizarse sin apartarse del alcance de la invención. Debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a las realizaciones expuestas en los siguientes ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones, o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras.

30 Ejemplos

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de células hASC

35 Se prepararon ASC humanas a partir de lipoaspirados de tejido adiposo humano de donantes adultos sanos. En resumen, los aspirados de tejido adiposo humano de donantes sanos varones y mujeres se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se digirieron con colagenasa al 0,075 % (Tipo I, Invitrogen, Carlsbad, CA). La muestra digerida se lavó con suero bovino fetal al 10 % (FBS), se trató con NH₄Cl 160 mM para eliminar los eritrocitos restantes y se suspendió en medio de cultivo (medio de Eagle modificado por Dulbecco; DMEM) con FBS al 10 %. Las células se sembraron (2-3 x 10⁴ células/cm²) en matraces de cultivo de tejidos y se expandieron (37 °C, CO₂ al 5 %), con cambio de medio de cultivo cada 3-4 días. Las células se transfirieron a un nuevo matraz (10³ células/cm²) cuando alcanzaron el 90 % de confluencia. Para todos los experimentos, se usaron células agrupadas de cultivos expandidos independientemente de donantes sanos (tres varones y tres mujeres; 35-47 años de edad). Las células se agruparon y los experimentos se realizaron en aproximadamente la misma población por duplicado (duplicando 12-16).

50 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocítica usando Ficoll-paque Plus (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia) siguiendo el protocolo del proveedor. En resumen, las muestras de sangre se diluyeron con una solución salina equilibrada y se añadió Ficoll para crear un gradiente de densidad. Tras la centrifugación, se recogió la superficie de contacto que contenía células mononucleares. La pureza se verificó mediante citometría de flujo. Las capas leucocíticas fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Transfusiones de la Comunidad Autónoma de Madrid, España.

55 Proteínas recombinantes y anticuerpos

Las proteínas recombinantes APRIL y BAFF se adquirieron en R&D Systems (Minneapolis, MN), CXCL12 e IFN- γ en Peprotech (Londres, RU); LPS (*Escherichia coli* 055:B5) fue de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y el poli I:C de InvivoGen (San Diego, CA). Para la citometría de flujo, los anticuerpos monoclonales primarios contra BCMA, TACI, HLA-I, HLA-II, CD80, CD86 y un control de isotipo fueron de BD Bioscience (San José, CA). Los anticuerpos para la transferencia Western fueron anti-fosfo-Akt (Ser473), -Akt, -fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), -ERK1/2, -JNK (todos de Cell Signaling Technology, Beverly, MA), fosfo-JNK (Thr 183/Tyr185) de Invitrogen (Carlsbad, CA). Los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-conejo bovina y anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca).

65 RT-PCR

Se aisló ARN total de hASC cultivadas o PBMC recién purificadas (control positivo) con reactivo TRI (Sigma) y se usó (1-2 µg) para la transcripción inversa con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se realizó una PCR semicuantitativa con dilución en serie de ADNc (1:0, 1:5, 1:25) usando el kit de mezcla maestra 5'PRIME con un termociclador (iCycler; BioRad). La actina β sirvió como control interno. Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes: APRIL directo 5'-AAGGGTATCCCTGGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 5) e inverso 5'-GCAGGACAGAGTGCTGCTT-3' (SEQ ID NO: 6), BAFF directo 5'-ACTGAAAATCTTTGAACCACCAG-3' (SEQ ID NO: 7) e inverso 5'-TTGCAAGCAG TCTTGAGTGAC-3' (SEQ ID NO: 8), TACI directo 5'-CAACTCGGGAAGGTACCAAGGATT-3' (SEQ ID NO: 9) e inverso 5'-CGCCACCAGGAAGCAGCAGAGGAC-3' (SEQ ID NO: 10), BCMA directo 5'-TTTTTCGTGCTAATGTTTTTGCTAA-3' (SEQ ID NO: 11) e inverso 5'-TTCATCACCAGTCTGCTCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 12), BAFF-R directo 5'-CTGGTCTGGTGGGTCTG-3' (SEQ ID NO: 13) e inverso 5'-ACCTTGTCAGGGGCTCT-3' (SEQ ID NO: 14), actina beta directo 5'-CCCAGCACAAATGAAGATCAA-3' (SEQ ID NO: 15) e inverso 5'-CGATCCACACGGAGTACTTG-3' (SEQ ID NO: 16) (todos de Sigma).

15 Citometría de flujo

Se recogieron hASC, se tiñeron con anticuerpos acoplados al fluorocromo apropiados y se midieron mediante citometría de flujo (BD FACS Calibur). Los datos se analizaron usando el programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR).

20 Viabilidad y proliferación celular

Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se cultivaron hASC (3,5 x 10³ células/pocillo) durante 6 días en placas de 96 pocillos con 100 ng/ml de APRIL o BAFF. La absorbancia (DO a 490 nm) se midió en un lector de placas ELISA (n = al menos tres experimentos). Los valores se normalizaron con respecto a la absorbancia de las células cultivadas sin estímulos (100 %). Además, se midió la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico de incorporación de BrdU. Se cultivaron hASC en placas p60 con 100 ng/ml de APRIL o BAFF; se añadió BrdU (20 µM) durante los últimos tres días. En el día 6, se detectó la incorporación de BrdU mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-BrdU. Se realizaron tres ensayos independientes de MTS y BrdU, y se incluyeron por triplicado para cada condición.

Ensayo de inmunosupresión

Para el marcaje con CFSE, se lavaron las PBMC recién purificadas (10-20 x 10⁶) exhaustivamente para eliminar el FBS, se volvieron a suspender en 200 µl de una solución de CFSE 10 pM (Sigma) y se incubaron con agitación constante (37 °C, 10 min). Las células se lavaron y se cultivaron durante la noche, y se usó una alícuota para configurar y controlar la tensión de FL-1 para CFSE en el citómetro. Tras reposar toda la noche, las PBMC marcadas con CFSE se activaron con el kit de activación de linfocitos T Pan (microperlas recubiertas con anti-CD3, -CD2 y -CD28, Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante, o se dejaron sin activar. Dos días antes de la activación de PBMC, se sembraron hASC en una placa de 24 pocillos (4 x 10⁴ células/pocillo). Las PBMC (10⁶ células/ml) se cultivaron solas o con hASC, con o sin BAFF o APRIL (100 ng/ml). En el día 5, se recogieron las PBMC y se determinó la proliferación celular de acuerdo con la pérdida de CFSE en el canal FL-1. Los datos se analizaron usando el software Cellquest-Pro en linfocitos activados (según las propiedades de dispersión hacia adelante/dispersión lateral). El porcentaje de linfocitos en proliferación se calculó seleccionando en la región (MI) del canal FL-1 correspondiente a las últimas 48 h de cultivo (tres generaciones). Se usaron perlas CalIBRITE (BD Bioscience) antes de cada ensayo para calibrar el citómetro.

Activación y señalización

Se estimularon hASC con 100 ng/ml de APRIL o BAFF (10, 30, 60, 120 min, 37 °C), se colocaron en hielo, se lavaron con PBS helado y se lisaron con tampón de lisis celular (Roche, Indianápolis, IN). Los extractos se cuantificaron por absorbancia, se resolvieron en SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia. Los anticuerpos usados fueron anti-fosfo-Akt (Ser473), -Akt, -fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y -ERK1/2 (BD Bioscience); los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-conejo bovina y anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante.

Detección de citocinas

Se cultivaron células hASC con 100 ng/ml de APRIL, BAFF o sin estímulo, y luego se estimularon con 1 µg/ml de LPS o poli I:C. Se midió la concentración de IL-6 e IL-8 en el medio después de 48 h, mediante un inmunoensayo de matriz de perlas citométricas (CBA) (BD Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se adquirieron usando un citómetro FACScalibur, y se analizaron con el software de matriz FCAP (BD Bioscience). Como alternativa, las células hASC se cultivaron con medio o IFN γ a 10, 30 o 100 ng/ml; o CXCL12 10, 30 o 100 nM. Los sobrenadantes se recogieron cinco días después. Las concentraciones de APRIL y BAFF en el medio se determinaron mediante ELISA (R&D Systems para BAFF, Bender MedSystem para APRIL).

Transferencia de tipo Western

Se estimularon hASC sembradas ($1,5 \times 10^4$ células/cm²) con APRIL o BAFF (100 ng/ml) y se lisaron con tampón de lisis (Roche) con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las proteínas de los extractos se cuantificaron mediante la absorbancia con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce), y se resolvieron cantidades iguales de homogeneizado de proteínas en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las transferencias se bloquearon en TBS-T que contenía BSA al 5 % y se sondaron con anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser473), -Akt, anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y anti- ERK1/2 (todos de Cell Signaling Technology). Las membranas se lavaron en TBS-T, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Dako), y se detectó la reactividad con ECL (GE Healthcare).

Estadística

El análisis estadístico (prueba t de Student) se realizó con GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). Los resultados se expresan como la media \pm desviación típica. Los valores *p* (bilateral) *** *p* < 0,0001, ** *p* < 0,001 y * *p* < 0,001 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Expresión de APRIL, BAFF y sus receptores en hASC

Para estudiar el perfil de expresión del sistema de APRIL/BAFF mediante RT-PCR, se prepararon muestras de ARNm de hASC cultivadas y se analizaron usando los cebadores humanos mencionados anteriormente. Se detectaron transcripciones de ARNm para ambos ligandos, para BCMA y TACI, receptores compartidos por APRIL y BAFF, y para BAFF-R, que se une exclusivamente a BAFF (Fig. 1A). Se usaron PBMC purificadas a partir de capas leucocíticas como control positivo, ya que expresan a todos los miembros de la familia; APRIL y BAFF son producidos por monocitos, y TACI, BCMA y BAFF-R, por linfocitos B y células plasmáticas. El análisis de los sobrenadantes de hASC mostró una concentración de proteína APRIL de $3,97 \pm 0,72$ ng/ml (*n* = 6, día 6), mientras que BAFF fue indetectable (Fig. 1B).

La expresión de BCMA y TACI se confirmó mediante citometría de flujo (Fig. 1C), que no detectó BAFF-R, probablemente debido al anticuerpo o al procedimiento de tinción usado. Los resultados muestran que el sistema de APRIL/BAFF, compuesto de dos ligandos y tres receptores, está presente en hASC, y que las hASC cultivadas *in vitro* secretan APRIL al medio mientras que BAFF permanece indetectable.

APRIL y BAFF activan las vías de transducción de ERK y PI3K

Se estimularon ASC humanas con APRIL o BAFF, y se analizaron las cinéticas de fosforilación de las MAP quinasas (p38, ERK/2, JNK), Akt y I κ B α . mediante transferencia Western. Tanto APRIL como BAFF indujeron una rápida fosforilación de Akt y ERK1/2, con una activación más potente para Akt que para ERK1/2 (Fig. 2; no hay un efecto claro sobre JNK, I κ B α o p38). Las bandas de transferencia Western sugirieron que BAFF potencia una respuesta mayor y más sostenida que APRIL, probablemente debido a la sinergia del receptor específico de BAFF, BAFF-R, con señalización de TACI y/o BCMA. Estos datos indican que los ligandos de APRIL y BAFF son capaces de señalizar a través de sus receptores en hASC mediante la activación de las proteínas quinasa Akt y ERK1/2.

APRIL y BAFF mejoran la proliferación de hASC de una manera dependiente de ERK

En un ensayo MTS, ambas citocinas mejoraron el crecimiento basal de hASC tras 6 días en cultivo, aunque BAFF fue un estimulante más potente que APRIL (140 % y 114 % de aumento, respectivamente, considerando un crecimiento basal del 100 %; Fig. 3A). El mayor efecto de BAFF en comparación con APRIL podría atribuirse a su unión a BAFF-R. Se midió la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU a hASC estimuladas por APRIL o por BAFF, y se observaron aumentos similares en el porcentaje de células positivas en BrdU, del 13 % (control) al 29,4 % (BAFF) y 27,5 % (APRIL) (Fig. 3B). Se probó si Akt o ERK participan en el mecanismo subyacente a la proliferación de hASC aumentada por APRIL/BAFF, usando inhibidores de PI3K (LY294002) y activación de ERK (U0126) para bloquear estas vías. El ensayo MTS mostró una disminución en el crecimiento basal de las hASC del 100 % (control) al 60,3 % cuando se añadió PI3K, pero no el inhibidor de ERK al medio (Fig. 3C), lo que indica la participación de la vía de transducción de PI3K en el crecimiento basal de hASC. APRIL y BAFF no potenciaron el crecimiento celular cuando se inhibió ERK, pero no PI3K, lo que implica que ambos ligandos de TNF inducen este efecto a través de la señalización de ERK (Fig. 3C).

APRIL y BAFF no alteran las propiedades inmunológicas de hASC

APRIL y BAFF se sobrepresaron en el suero y en las lesiones tisulares de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas tales como la AR o LES. Por lo tanto, es interesante, desde un punto de vista clínico y terapéutico, comprender si BAFF y APRIL pueden modular las características inmunológicas de hASC. Dado que APRIL/BAFF se describen como coestimulantes con los ligandos de TLR (receptores de tipo Toll), y su secreción se induce mediante la activación

de TLR, se ensayó si este era el caso en hASC. Las células se cultivaron solas o con APRIL o BAFF, luego se activaron con LPS o poli I:C. Ni el ligando indujo la secreción de APRIL o BAFF, ni APRIL o BAFF afectaron a la producción de IL-6 o IL-8 inducida por LPS o poli I:C (Fig. 4A). La capacidad inmunomoduladora de hASC es un factor clave en su potencial para el uso terapéutico. El efecto de BAFF/APRIL sobre la capacidad de hASC para suprimir las respuestas inmunitarias se ensayó analizando la proliferación de PBMC marcadas con CFSE activadas solas o en presencia de hASC alogénicas cultivadas con medio solo o complementado con BAFF o APRIL (Fig. 4B). Como estaba previsto, las hASC suprimieron la proliferación de PBMC de manera eficaz. La adición de APRIL o BAFF al medio no alteró la capacidad de hASC para suprimir la proliferación de PBMC. La activación de BAFF/APRIL no indujo la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima catabolizadora del triptófano que participa en la supresión de la proliferación de los linfocitos. Para ensayar si la activación de APRIL o BAFF modifica el perfil inmunogénico de hASC, se analizó la expresión de HLA-I, HLA-II, CD80 y CD86 mediante citometría de flujo, y se encontró que BAFF y APRIL no afectan a la expresión de hASC de estas moléculas de activación. Estos resultados indican que la estimulación con APRIL o BAFF no afecta notablemente a las propiedades inmunogénicas e inmunomoduladoras de hASC.

15 **La secreción de APRIL y BAFF en hASC es inducida diferencialmente por IFN- γ y CXCL12**

Se evaluaron las moléculas que podrían potenciar la secreción de APRIL o BAFF en hASC, centrándose en IFN- γ y CXCL12, dos citocinas que participan en la inmunosupresión mediada por hASC y la migración celular, respectivamente; La Fig. 4C muestra una curva de respuesta a la dosis que mide las concentraciones de APRIL y BAFF tras la estimulación con IFN- γ (10, 30, 100 ng/ml) o CXCL12 (10, 30, 100 nM). Estos resultados demuestran que CXCL12 potencia preferentemente a APRIL, mientras que IFN- γ potencia la secreción de BAFF, lo que indica que cada citocina TNF es secretada por hASC en respuesta a diferentes estímulos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> CELLERIX S.A.
 CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
- 30 <120> MEDIOS Y MÉTODOS DE CULTIVO DE CÉLULAS MADRE
- <130> P6263PC00
- <150> EP 10382244.1
 <151> 10-09-2010
- 35 <160> 16
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*
- 45 <400> 1

ES 2 712 102 T3

Met Asp Asp Ser Thr Glu Arg Glu Gln Ser Arg Leu Thr Ser Cys Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Arg Glu Glu Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro
 20 25 30

Arg Lys Glu Ser Pro Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu
 35 40 45

Ala Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val
 50 55 60

Ser Phe Tyr Gln Val Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gly His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Ala Pro Lys Ala Gly Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu
 100 105 110

Lys Ile Phe Glu Pro Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn
 115 120 125

Ser Arg Asn Lys Arg Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln
 130 135 140

Asp Cys Leu Gln Leu Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys
 145 150 155 160

ES 2 712 102 T3

Gly Ser Tyr Thr Phe Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser
 165 170 175

Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr
 180 185 190

Phe Phe Ile Tyr Gly Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met
 195 200 205

Gly His Leu Ile Gln Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu
 210 215 220

Ser Leu Val Thr Leu Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240

Pro Asn Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly
 245 250 255

Asp Glu Leu Gln Leu Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu
 260 265 270

Asp Gly Asp Val Thr Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 275 280 285

<210> 2
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

5

<400> 2

Met Pro Ala Ser Ser Pro Phe Leu Leu Ala Pro Lys Gly Pro Pro Gly
 1 5 10 15

Asn Met Gly Gly Pro Val Arg Glu Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Gly Ala Ala Leu Gly Ala Val Ala Cys Ala Met Ala Leu
 35 40 45

Leu Thr Gln Gln Thr Glu Leu Gln Ser Leu Arg Arg Glu Val Ser Arg
 50 55 60

Leu Gln Gly Thr Gly Gly Pro Ser Gln Asn Gly Glu Gly Tyr Pro Trp
 65 70 75 80

Gln Ser Leu Pro Glu Gln Ser Ser Asp Ala Leu Glu Ala Trp Glu Asn
 85 90 95

10

ES 2 712 102 T3

Gly Glu Arg Ser Arg Lys Arg Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Gln Lys
 100 105 110

Lys Gln His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys
 115 120 125

Asp Asp Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg
 130 135 140

Gly Arg Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala
 145 150 155 160

Gly Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe
 165 170 175

Thr Met Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr
 180 185 190

Leu Phe Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr
 195 200 205

Asn Ser Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile
 210 215 220

Leu Ser Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro
 225 230 235 240

His Gly Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu
 245 250

<210> 3
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> *H. sapiens*

5

<400> 3

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15

Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
 20 25 30

Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45

Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
 50 55 60

10

ES 2 712 102 T3

Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
65 70 75 80

Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
85 90 95

Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
100 105 110

Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
115 120 125

Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
130 135 140

Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
145 150 155 160

Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
165 170 175

Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
180

<210> 4
<211> 293
<212> PRT
<213> *H. sapiens*

5

<400> 4

Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1 5 10 15

Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
20 25 30

Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
35 40 45

Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
50 55 60

Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65 70 75 80

His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
85 90 95

10

ES 2 712 102 T3

Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
 100 105 110

Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
 115 120 125

Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
 130 135 140

Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
 145 150 155 160

Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
 165 170 175

Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
 180 185 190

Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
 195 200 205

Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
 225 230 235 240

Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
 245 250 255

Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
 260 265 270

His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
 275 280 285

Gly Gly Pro Gly Ala
 290

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 5
 aagggtatcc ctggcagagt

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
gcaggacaga gtgctgctt 19
 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
actgaaaatc tttgaaccac cag 23
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
ttgcaagcag tcttgagtga c 21
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Cebador
 30
 <400> 9
caactcggga aggtaccaag gatt 24
 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
cgccaccagg aagcagcaga ggac 24
 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 11
ttttcgtgct aatgtttttg ctaa 24
 60

ES 2 712 102 T3

	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 12	
10	ttcatcacca gtctgtct ttc	24
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 13	
20	ctggtctgg tgggtctg	18
	<210> 14	
	<211> 18	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 14	
	acctgtcca ggggtct	18
	<210> 15	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador	
	<400> 15	
	cccagcacia tgaagatcaa	20
45	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 16	
55	cgatccacac ggagtactg	20

REIVINDICACIONES

1. El uso de un medio de cultivo para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que dicho medio comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
2. El uso de un medio de cultivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 mM de un ligando de BCMA y TACI.
3. Una composición que comprende: (a) un medio de cultivo; y (b) células madre mesenquimales, en la que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en la que el medio de cultivo comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
4. Un método para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo, que comprende: (a) proporcionar una población de células madre mesenquimales; (b) proporcionar un medio de cultivo; (c) poner en contacto las células madre mesenquimales con el medio de cultivo; y (d) cultivar las células madre en condiciones apropiadas; medio que comprende un ligando de BCMA y TACI, en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
5. El uso de un ligando de BCMA y TACI en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
6. Un ligando de BCMA y TACI para su uso como un medicamento para el tratamiento de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
7. El uso de (a) una superficie sólida; y (b) un ligando de BCMA y TACI, en un método para expandir una población de células madre mesenquimales, en el que las células madre mesenquimales se derivan de tejido adiposo y en el que el ligando de BCMA y TACI se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (ii) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con un polipéptido que comprende todo el dominio de tipo TNF del polipéptido de SEQ ID NO: 1;
 - (iii) un polipéptido que muestra una identidad de al menos el 85 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; y
 - 5 (iv) un polipéptido soluble que muestra una identidad de al menos el 85 % con el dominio extracelular del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho ligando comprende BAFF y/o APRIL.
- 10 9. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho ligando comprende BAFF y/o APRIL.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 7, en el que dicho ligando comprende BAFF y/o APRIL.
- 15 11. El ligando de BCMA y TACI para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho ligando comprende BAFF y/o APRIL.

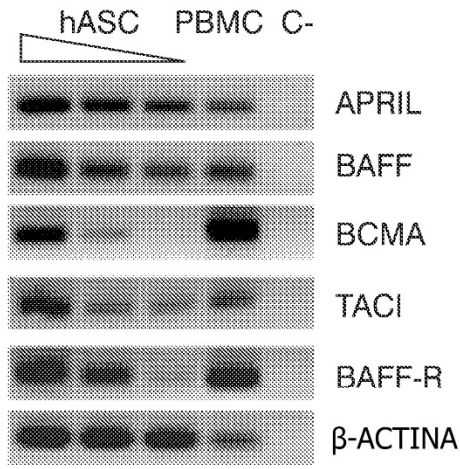


FIG. 1A

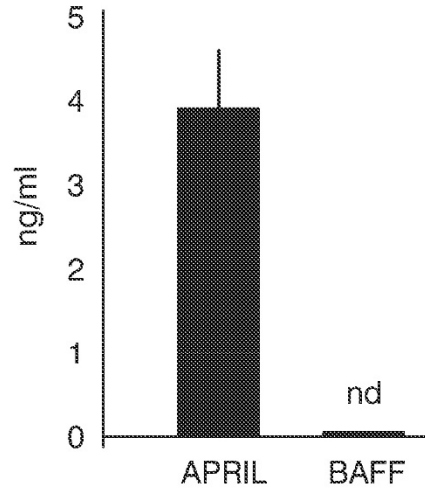


FIG. 1B

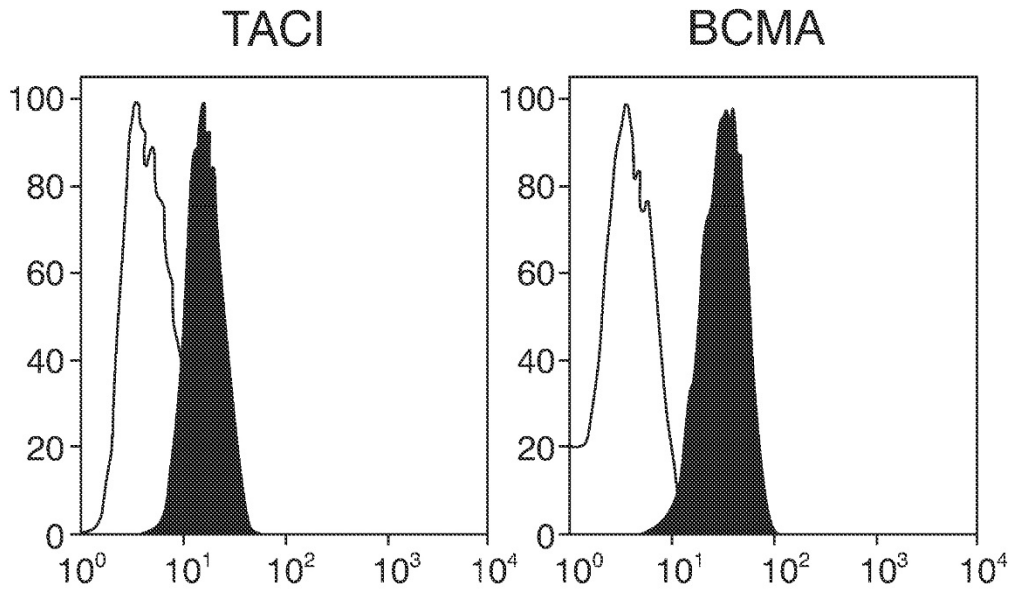


FIG. 1C

FIG. 1D

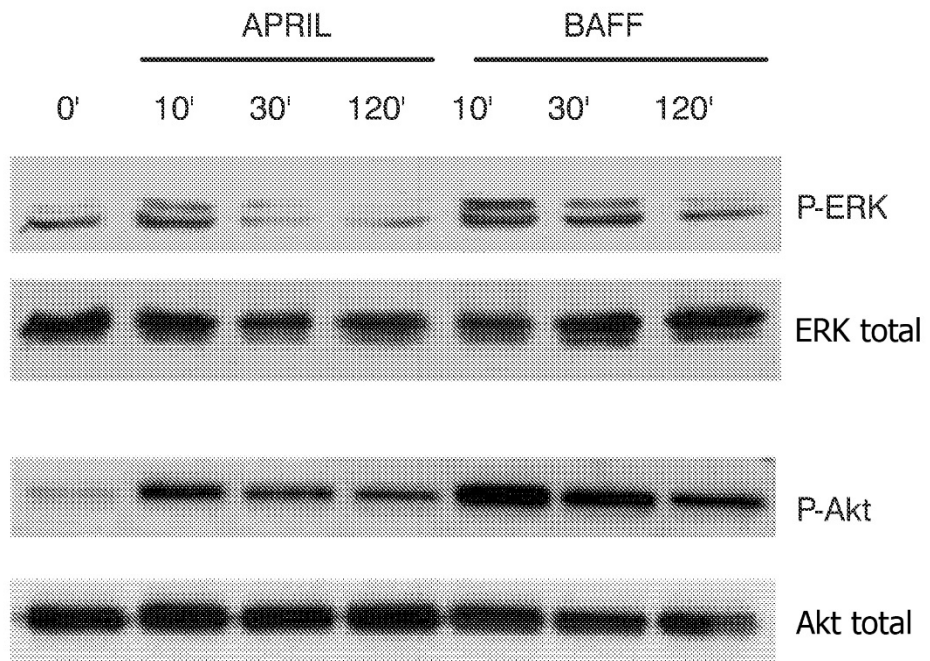


FIG. 2

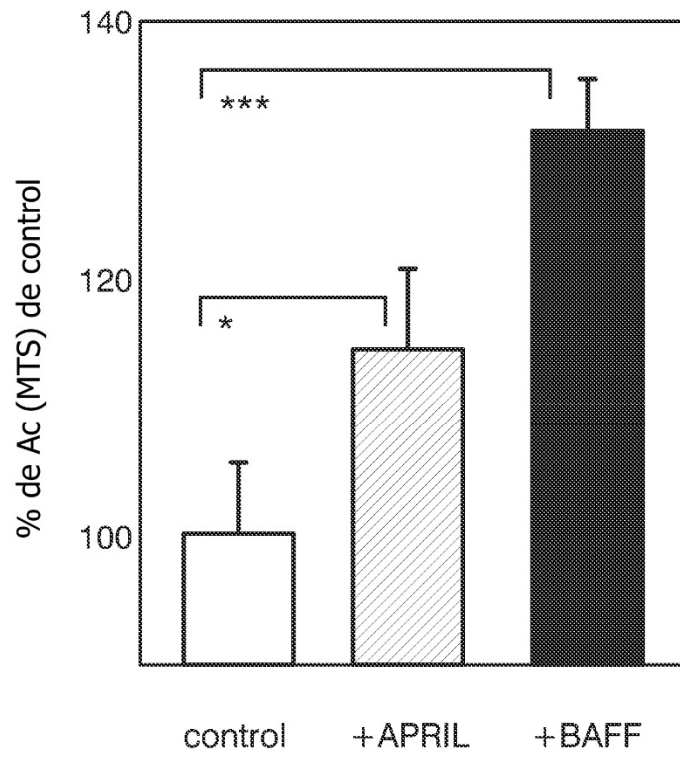


FIG. 3A

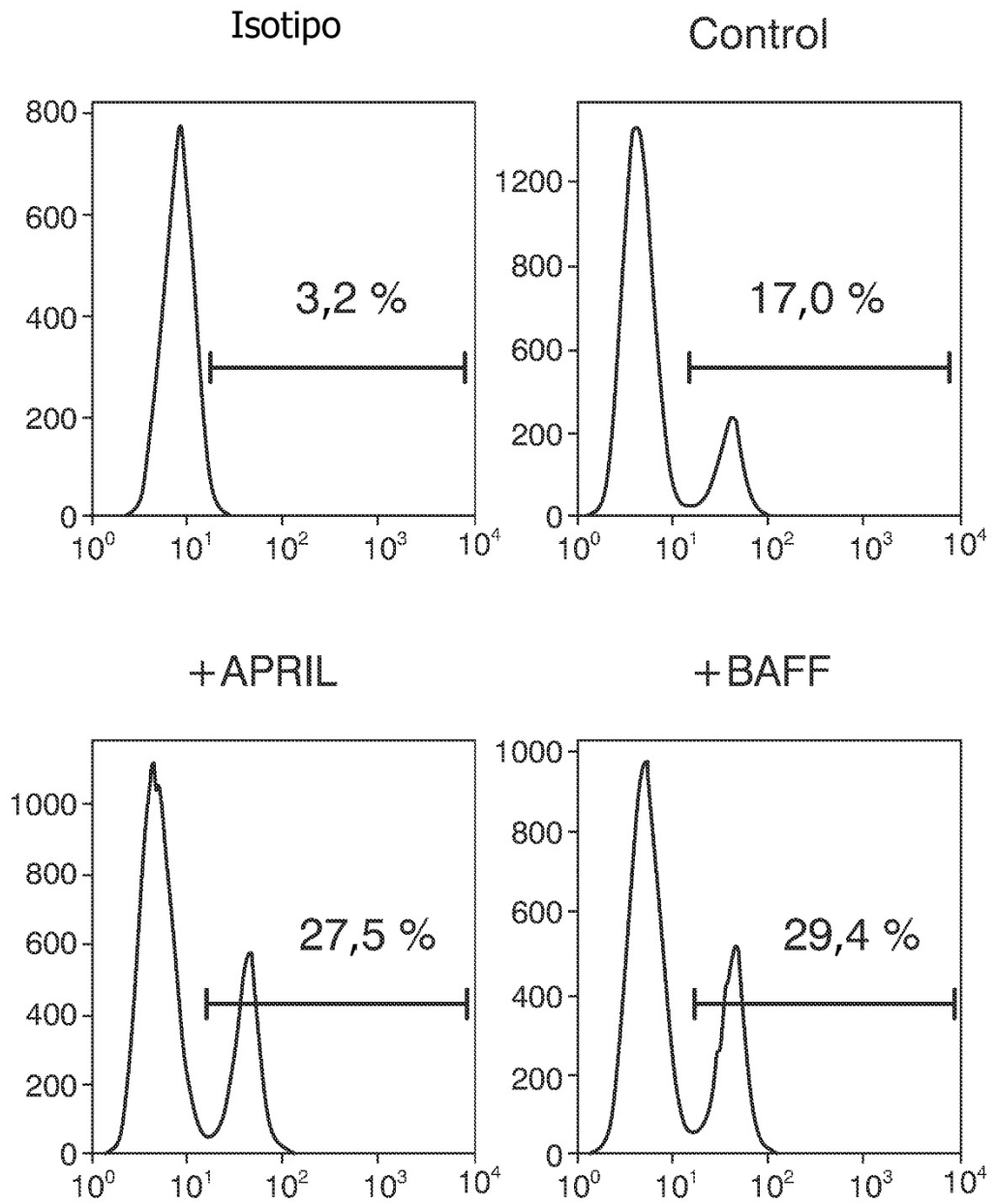


FIG. 3B

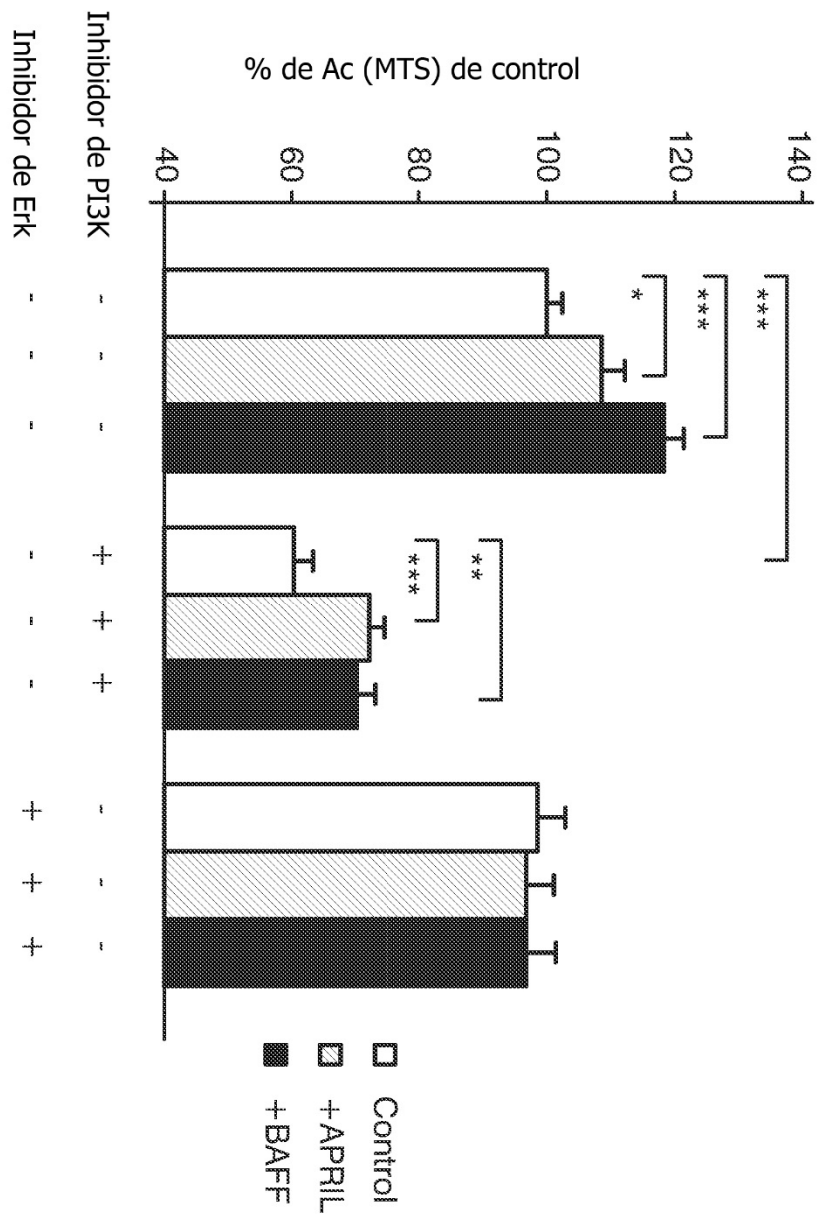


FIG. 3C

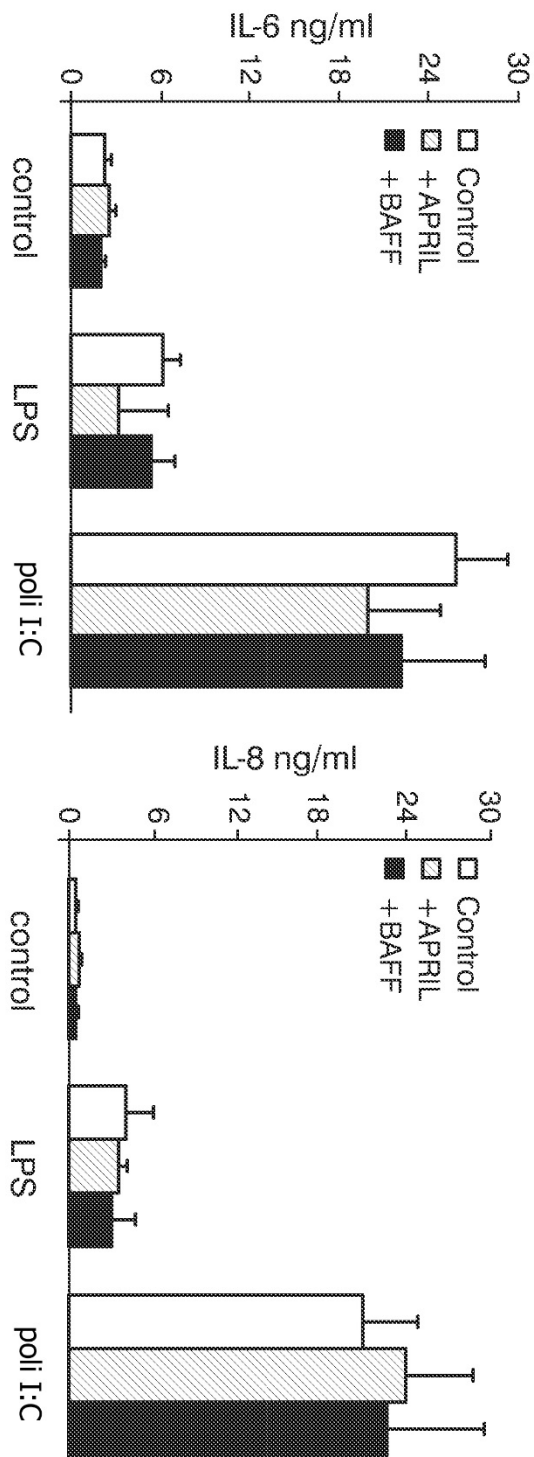


FIG. 4A

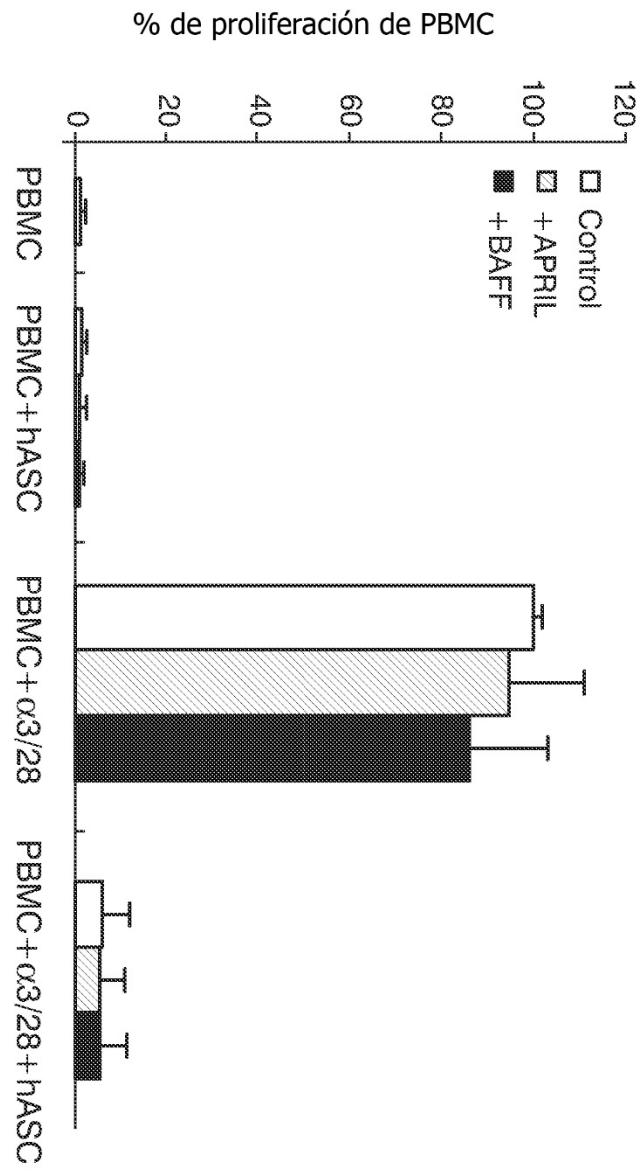


FIG. 4B

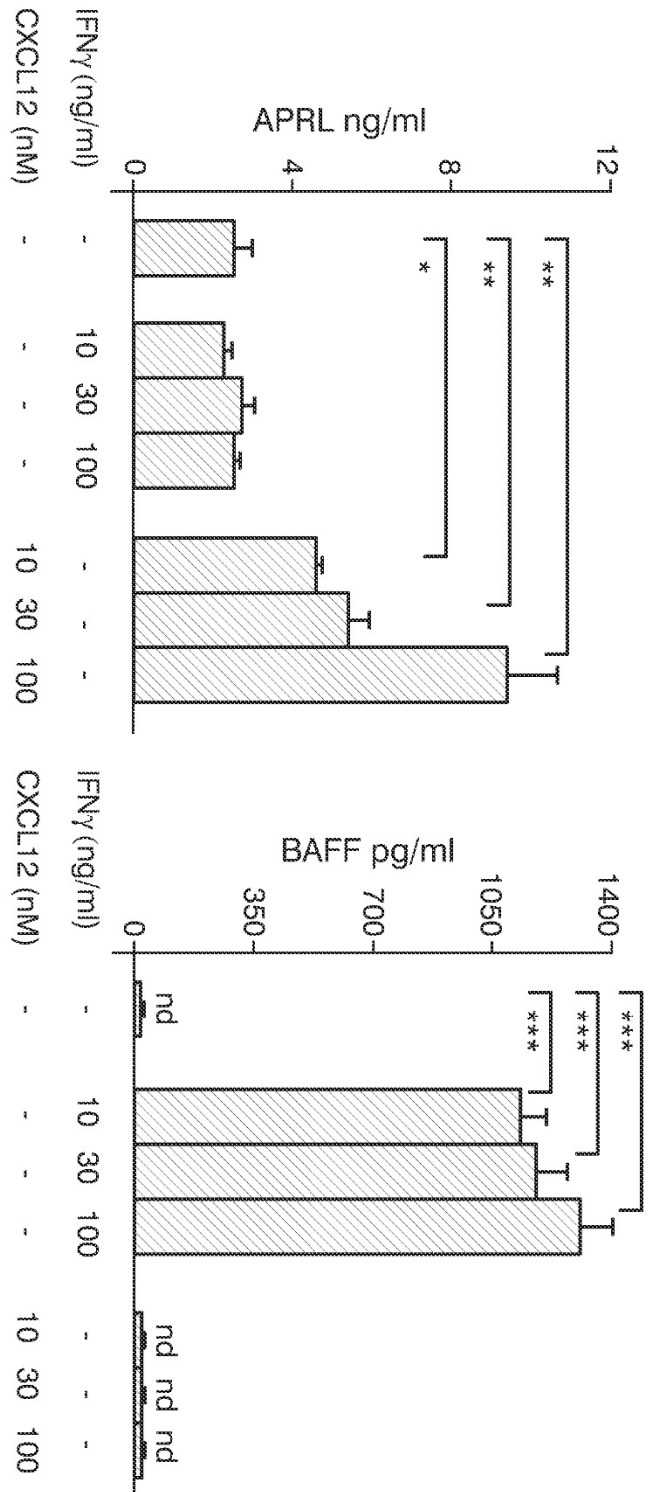


FIG. 4C