

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 331**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2012 PCT/EP2012/060690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 12727636 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2718416**

54 Título: **Expansión de células madre en biorreactores de fibra hueca**

30 Prioridad:

06.06.2011 US 201161493737 P

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

28.05.2020

73 Titular/es:

**REGENESYS BVBA (100.0%)
Bio-Incubator Leuven Gaston Geenslaan 1
3001 Heverlee, BE**

72 Inventor/es:

**PINXTEREN, JOZEF, ALBERT, MARTHA y
CRAEYE, DAVID**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 763 331 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

Expansión de células madre en biorreactores de fibra hueca

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a producir grandes números de células usando tecnología de biorreactor de perfusión continua de fibra hueca. Las células son células madre no embrionarias, no germinativas; expresan telomerasa, no se transforman, tienen un cariotipo normal y se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

Antecedentes de la invención

Se ha usado tecnología de biorreactores de fibra hueca para obtener la expansión de células de alta densidad. En general, las células se expanden dentro y/o fuera de una multitud de fibras huecas. Debido a la alta área superficial proporcionada por este diseño, el usar las fibras como sustrato de cultivo permite la producción de grandes números de células, especialmente para aplicaciones clínicas. Esta tecnología, desarrollada por primera vez en los años 70 por Knazek, ha experimentado numerosos desarrollos y mejoras. El concepto básico es proporcionar una matriz de fibra que es permeable a nutrientes, gases y otros componentes de medio básico, y a productos residuales celulares, pero que es impermeable a las células y sobre la que se pueden expandir las células.

El cultivo celular sobre membranas tubulares semipermeables se inventó inicialmente por Knazek a principios de los años 70. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente U.S. 3.821.087; 3.883.393; 4.220.725; 4.184.922; y 4.200.689. Según esa invención, se dejaron sedimentar células suspensas en medio nutritivo sobre las superficies externas de capilares que se perfundieron continuamente por medio nutritivo oxigenado que circulaba a través de los capilares. Las sustancias nutrientes difundieron desde el medio de perfusión a través de la pared capilar y dentro de las células, mientras que los productos residuales celulares difundieron desde las células a través de la pared del capilar hasta el perfundido del que podrían ser recuperados los productos.

Esa tecnología se desarrolló como una respuesta a intentos fallidos de cultivar células hasta densidades y/o estructuras que se aproximan a la de tejido vivo. Principalmente, hubo problemas cultivando las células viables hasta densidades muy altas, tales como a las que se encuentran en los tejidos. Primero, los componentes del medio deben difundir a través de capas de células para llegar a todas las células a medida que aumenta el espesor de la capa de células. Segundo, se debe mantener un microentorno adecuado durante el cultivo celular. Así, el fluido inmediatamente adyacente a las células en crecimiento está cambiando continuamente a medida que avanza el metabolismo celular y vuelve a su estado original solo en el modo escalonado cuando el medio de cultivo se cambia o agita. Tercero, se requiere una retícula o material adecuado sobre el que cultivar las células densas. La invención de Knazek resolvió estos problemas proporcionando fuentes de nutrientes dentro de la masa celular que suministran tanto moléculas esenciales grandes como pequeñas; sumideros dentro de la masa celular retiran los productos de metabolismo; un microentorno adecuado; una retícula para permitir el crecimiento en tres dimensiones; y un área superficial para cultivos celulares mono- y/o multi-capas que es grande con respecto al volumen requerido por las técnicas de cultivo celular convencionales.

Desde la invención original, esta tecnología se ha usada satisfactoriamente para expandir diversos tipos de células y existe un gran conjunto de bibliografía científica y de patentes dirigida a diversas mejoras de esta tecnología básica. Estas mejoras han tratado diversas modificaciones técnicas para optimizar el uso de esta tecnología para lograr los objetivos originales de Knazek. En la industria, esta tecnología ha llegado a designarse cultivo celular de "fibra hueca" y, en una configuración de biorreactor, proporciona un cultivo celular en biorreactor de fibra hueca. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 3.997.396; 4.184.922; 4.200.689; 4.220.725; 4.804.628; 4.999.298; 5.126.238; 5.162.225; 5.627.070; 5.656.421; 5.712.154; 6.001.585; 6.680.166; 6.911.201; 6.933.144; 7.534.609; publicaciones de EE. UU. 2001/0044413; 2003/0224510; 2005/0032218; 2005/0003530; 2006/0205071; 2007/0298497; 2008/0206733; 2008/0213894; 2008/0220522; 2008/0220523; 2008/0227190; 2008/248572; 2008/254533; 2009/0191631; 2009/0196901; 2010/0042260; 2010/0144037; 2010/0209403; 2010/0233130; 2010/0267134; documentos de patente WO 91/18972; WO 95/13088; WO 95/21911; WO 01/23520; WO 07/012144; WO 10/034468; WO 10/149597; y Gloeckner et al., Biotech Prog 17:828-31 (2001). Por ejemplo, el documento de patente US 2008/248572 se refiere al tratamiento de superficies poliméricas del biorreactor, para promover la proliferación de células adherentes.

El documento de patente U.S. 2010/0267134 desvela el aislamiento, la caracterización y la diferenciación de células madre adultas de la línea germinal humana usando cultivo en capilares de fibra hueca. Esta referencia describe células madre espermatogoniales en crecimiento sobre capas alimentadoras de células de Sertoli que se han sembrado sobre la superficie del capilar de fibra hueca.

Los documentos de patente U.S. 2007/0298497 y 2008/0220523 desvelan la tecnología de biorreactores de fibra hueca aplicada a células madre mesenquimatosas. Se describen sistemas de expansión de células y sus métodos de uso para cultivar células madre mesenquimatosas.

El documento de patente U.S. 2009/0196901 se refiere a métodos y sistemas para facilitar el crecimiento y la diferenciación de células madre derivadas de adiposas. Las células se pueden cultivar con una estructura de armazón biológicamente compatible que puede comprender fibras huecas para el crecimiento celular y la diferenciación, siendo el armazón cultivado en un biorreactor para el crecimiento y la diferenciación de las células.

La referencia sugiere que se pueden usar otros tipos de células madre en este proceso. Sin embargo, antes del crecimiento y la diferenciación sobre el armazón de células tejidas para el cultivo en el biorreactor, las células ya se han expandido significativamente en cultivo celular. Esto produce un número suficiente de células madre de manera que las células se pueden concentrar y suspender en una matriz tal como un biomaterial de gel y aplicar al armazón tridimensional.

El documento de patente U.S. 2010/0209403 desvela métodos de cultivo de células madre mesenquimatosas placentarias y adiposas adherentes en biorreactores que pueden comprender fibras huecas.

El documento de patente WO 95/13088 desvela la tecnología de fibra hueca para el crecimiento de células madre hematopoyéticas con soporte de células del estroma.

El documento de patente WO 91/18972 desvela biorreactores de fibra hueca para el cultivo de células madre hematopoyéticas de la médula ósea.

El documento de patente WO 07/012144 desvela biorreactores de fibra hueca que mejoran uniendo conectores a la superficie para propagar células madre embrionarias y otras células.

El documento de patente WO 10/149597 desvela biorreactores de fibra hueca para el crecimiento de células espermatozonales y de otras células de la línea germinal.

El documento de patente WO 10/034468 desvela la tecnología de fibra hueca en la que células adherentes se cultivan sin un recubrimiento, por ejemplo, células madre mesenquimatosas. El documento de patente WO 2008/109674 también desvela un sistema de expansión de células para el cultivo de células adherentes, por ejemplo células madre mesenquimatosas.

Antwiler et al. ("Bioreactor Design and Implementation," Stem Cell Bioengineering, Parekkadan and Yarmush, eds., pp. 49-62 (2009)) desvela un método para la expansión *ex vivo* de células madre mesenquimatosas a partir de tanto células mononucleares de la médula ósea como médula ósea completa usando un sistema de biorreactor de fibra hueca automatizado. El sistema comprendía un biorreactor de fibra hueca sintética conectado a medios estériles controlados por ordenador de bucle cerrado e intercambiadores de gas. En configuraciones experimentales, esto permitió que dosis terapéuticas de células madre mesenquimatosas se cultivaran a partir de pequeñas cantidades de aspirados individuales de médula ósea en el plazo de una cantidad de tiempo relativamente corta.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a expandir las células descritas en el presente documento en biorreactores de fibra hueca. La perfusión continua para la alimentación continua de nutrientes y la retirada de metabolitos residuales es un aspecto de la invención. También es un aspecto la recogida de moléculas secretadas deseadas.

La invención proporciona un método de expansión de células *ex vivo*, comprendiendo el método:

- a) sembrar las células sobre un sustrato de fibra hueca de manera que las células se adhieran al sustrato;
- b) expandir las células adheridas sobre el sustrato; y
- c) retirar las células expandidas del sustrato;

en donde las células son células madre no embrionarias no germinativas; expresan telomerasa, no se transforman, tienen un cariotipo normal, y se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

Las células se pueden expandir directamente de una muestra de tejido, por ejemplo, de médula ósea, sangre del cordón, o placenta, como preparaciones no purificadas o parcialmente purificadas. O las células pueden ser una preparación purificada de células que son sustancialmente homogéneas, que se han aislado y expandido previamente o purificado de otro modo. Así, la pureza de la preparación de células de partida puede estar prácticamente sin purificar (tal como a partir de células mononucleares de médula ósea totales) o desde 1 %-100 % puras. En algunas realizaciones, la pureza de las células para administración a un sujeto es aproximadamente 100 % (sustancialmente homogéneas). En otras realizaciones, es 95 % a 100 %. En algunas realizaciones, es 85 % a 95 %. Sin embargo, el porcentaje puede ser aproximadamente 1 %-5 %, 5 %-10 %, 10 %-15 %, 15 %-20 %, 20 %-25 %, 25 %-30 %, 30 %-35 %, 35 %-40 %, 40 %-45 %, 45 %-50 %, 60 %-70 %, 70 %- 80 %, 80 %-90 %, o 90 %-95 %. O el aislamiento/pureza se puede expresar en términos de duplicados de células donde las células han experimentado, por ejemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 o más duplicados de células.

Las células se pueden obtener de un único donante para la expansión y devolución a ese mismo donante (autólogo). O las células se pueden obtener de un único donante para la expansión y administración a un sujeto diferente (alógeno). O las células se pueden obtener de diferentes donantes.

5 Las células se pueden expandir (proliferar) mediante un número deseado de duplicaciones de células. Los intervalos incluyen desde dos veces hasta 1000 veces o más. El límite dependerá de la capacidad para proporcionar nutrientes suficientes y retirar residuos perjudiciales. En algunas realizaciones, la duplicación de células está en el intervalo de aproximadamente 2 - aproximadamente 10 veces, aproximadamente 10 - aproximadamente 50 veces, y aproximadamente 50 - aproximadamente 100 veces. Usando la tecnología descrita en la presente solicitud, se pueden producir más de 10^8 células a partir de un único donante.

15 Las células se pueden expandir, recoger y luego reintroducir en el biorreactor para expansión adicional. A efectos de la presente solicitud, una "serie" se refiere a una ronda de expansión (desde la introducción de las células hasta la recogida). Por consiguiente, las células se pueden recoger después de una o más de una serie. Un "pase" se refiere a una serie. Las células se pueden expandir a través de diferentes duplicaciones de células en cada serie. En una única serie, por ejemplo, las células se pueden expandir dos-diez veces. Sin embargo, con series repetidas, la expansión total puede ser mucho más alta (como se trata anteriormente).

20 Las células de la presente divulgación pueden expresar marcadores de pluripotencia, tales como oct4. También pueden expresar marcadores asociados a la capacidad replicativa extendida, tales como telomerasa. Otras características de la pluripotencia pueden incluir la capacidad para diferenciar en tipos de células de más de una capa germinal, tales como dos o tres de capas germinales embrionarias ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Dichas células pueden o pueden no ser inmortalizadas o transformadas en cultivo. Las células pueden ser altamente expandidas sin ser transformadas y también mantienen un cariotipo normal. Por ejemplo, en una realización, las células madre no embrionarias no germinativas pueden haber experimentado al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo, tal como 50, 60, o más, en donde las células no se transforman y tienen un cariotipo normal. Las células se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de cada uno de dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos, y puede incluir diferenciación en los tres. Además, las células pueden no ser tumorigénicas, tal como no productoras de teratomas. Si las células son transformadas o tumorigénicas, y se desea usarlas para infusión, dichas células pueden ser inhabilitadas de manera que no puedan formar tumores *in vivo*, como mediante tratamiento que previene la proliferación celular en tumores. Dichos tratamientos se conocen bien en la técnica.

35 Las células incluyen, pero no se limitan a, los siguientes aspectos numerados de la divulgación:

1. Células madre no embrionarias no germinativas expandidas aisladas, habiéndose sometido las células a al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo, en donde las células expresan oct4, no se transforman, y tienen un cariotipo normal.
- 40 2. Las células madre no embrionarias no germinativas de 1 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.
3. Las células madre no embrionarias no germinativas de 1 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.
- 45 4. Las células madre no embrionarias no germinativas de 3 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.
- 50 5. Las células madre no embrionarias no germinativas de 3 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.
6. Las células madre no embrionarias no germinativas de 5 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.
- 55 7. Células madre no embrionarias no germinativas expandidas aisladas que se obtienen por cultivo de tejido no embrionario no germinal, habiéndose sometido las células a al menos 40 duplicaciones de células en cultivo, en donde las células no se transforman y tienen un cariotipo normal.
- 60 8. Las células madre no embrionarias no germinativas de 7 anteriormente que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.
9. Las células madre no embrionarias no germinativas de 7 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.
- 65 10. Las células madre no embrionarias no germinativas de 9 anteriores que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.

11. Las células madre no embrionarias no germinativas de 9 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

12. Las células madre no embrionarias no germinativas de 11 anteriores que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.

13. Células madre no embrionarias no germinativas expandidas aisladas, habiéndose sometido las células a al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo, en donde las células expresan telomerasa, no se transforman, y tienen un cariotipo normal.

14. Las células madre no embrionarias no germinativas de 13 anterior que expresan además uno o más de oct4, rex-1, rox-1, o sox-2.

15. Las células madre no embrionarias no germinativas de 13 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

16. Las células madre no embrionarias no germinativas de 15 anterior que expresan además uno o más de oct4, rex-1, rox-1, o sox-2.

17. Las células madre no embrionarias no germinativas de 15 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

18. Las células madre no embrionarias no germinativas de 17 anterior que expresan además uno o más de oct4, rex-1, rox-1, o sox-2.

19. Células madre no embrionarias no germinativas expandidas aisladas que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos, habiéndose sometido dichas células a al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo.

20. Las células madre no embrionarias no germinativas de 19 anteriores que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.

21. Las células madre no embrionarias no germinativas de 19 anterior que se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

22. Las células madre no embrionarias no germinativas de 21 anteriores que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, o sox-2.

Las células descritas anteriormente se pueden preparar a partir de cualquier fuente de tejido deseable, que incluye, pero no se limita a, médula ósea, sangre del cordón umbilical, matriz del cordón umbilical, sangre periférica, placenta, sangre de la placenta, músculo, cerebro, riñón, y otros órganos sólidos. También se pueden obtener de líquidos secretados, tales como orina y sangre menstrual.

En una realización, las células derivan de tejido humano.

En la configuración del biorreactor de fibra hueca, existen varias consideraciones de diseño y varios parámetros que se pueden variar dependiendo de los objetivos asociados a la expansión de las células. Primero, se puede variar el número de fibras en el biorreactor. Se usa, en general, una pluralidad o haz de fibras para proporcionar un área superficial deseada y una alta densidad de células. Los intervalos prácticos en el número de fibras también variarán dependiendo de la longitud de las fibras. Así, la longitud también es variable. En general, la longitud de las fibras solo está limitada por la capacidad de mover eficientemente el medio nutritivo en contacto con las células, retirar residuos o productos celulares deseados, y liberar eficazmente las células del sustrato de fibra. Por consiguiente, puede variar el intervalo en la longitud de las fibras. Una consideración de diseño adicional es el espesor de la pared de fibra. El espesor de pared es variable y está limitado solo por los parámetros de proporcionar eficientemente nutrientes a las células y retirar eficientemente residuos o productos útiles de las células. Otra consideración de diseño es el tamaño de los poros en la pared de la fibra. Esto se diseña, en general, para permitir el paso de nutrientes a las células, arrastrar residuos, proporciona productos deseados a las células (tales como factores de crecimiento), retirar productos deseados de las células, y similares. Por ejemplo, el tamaño de poro se puede diseñar para excluir que ciertos factores que puedan estar presentes, por ejemplo, en suero, lleguen a las células. Una consideración de diseño adicional es la dimensión interna de las fibras huecas (tal como el diámetro de una fibra redonda). Las consideraciones para esta elección incluyen el acceso adecuado del medio de cultivo a la célula, para proporcionar nutrientes adecuados, retirar residuos, y para lograr densidades celulares deseadas. Una consideración de diseño adicional es la composición de la pared de fibra. Esto incluye una amplia variedad de materiales biocompatibles que proporcionan un sustrato sobre el que se pueden adherir las células. En algunas realizaciones, la adherencia se puede mejorar recubriendo el material de la pared con un sustrato promotor de la adherencia, tal como una proteína de la matriz extracelular.

Además, se puede encontrar más de un tipo de fibra en el biorreactor con respecto a los diversos parámetros descritos anteriormente. Esto es útil, por ejemplo, cuando se desea cocultivar diferentes tipos de células. El diseño de fibras óptimo se puede diferenciar para las diferentes células.

5 La pluralidad de fibras huecas, en general, está encerrada en la envoltura externa que se conecta deseablemente a los puertos de entrada y salida para perfundir medio dentro y/o alrededor de las fibras. En una realización, estas fibras se encuentran como parte de una cámara de crecimiento en el que perfunde (circula) el medio celular de manera que el medio circule dentro de y/o alrededor de las fibras. En una realización, las fibras se colocan en un
10 cartucho que está conectado a una bomba para la infusión del medio de cultivo celular y suplementos.

Los materiales de los que se pueden fabricar las fibras comprenden una gran variedad de materiales semipermeables biocompatibles. Dichos materiales permiten el crecimiento celular en las tres dimensiones, mientras que permiten que el medio de cultivo difunda a través de las paredes de la fibra para alimentar las células.

15 Las células a las que se refiere la invención pueden ser co-cultivadas con otros tipos de células con lo que se co-siembran, o que se han adherido por separado o de otro modo cultivado en la cámara de expansión. En una realización, las otras células se pueden unir a la superficie interior (o exterior) de la fibra antes de introducir las células de la invención. Por consiguiente, las células de la invención se pueden depositar sobre una monocapa de un tipo deseable de célula.
20

Las fibras huecas pueden ser previamente recubiertas con una o más proteínas de la matriz extracelular, por ejemplo, Matrigel, fibronectina, o colágeno, para potenciar la unión celular. Las proteínas de la matriz extracelular se pueden unir a la superficie interna y/o externa de las fibras. En general, la proteína de la matriz extracelular se puede
25 unir a la superficie por cualquiera de las metodologías que se describen en la patente de EE. UU. N° 5.872.094 y la patente de EE. UU. N° 6.471.689.

Los caudales también son variables que dependen de las células a expandir y la etapa del proceso. Por ejemplo, después de lograr la adhesión celular, después de la inoculación celular, el caudal se puede aumentar hasta un nivel
30 de estado estacionario. La tasa aumentaría después de la adherencia de las células y nuevamente para facilitar la recogida de las células del interior de las cámaras.

Se podría fabricar un sistema de cultivo capilar de fibra hueca diseñado a medida usando materiales fácilmente disponibles para el cultivo celular de mamífero mediante contrato por muchos vendedores diferentes. Algunos tipos
35 de sistemas de fibra hueca para el cultivo celular están comercialmente disponibles de empresas, por ejemplo, FiberCell Systems, Inc. (Frederick, Md.). Los sistemas de fibra hueca fabricados por FiberCell Systems están compuestos de fibras que tienen aproximadamente 200 micrómetros de diámetro. Las fibras se tapan en un cartucho que se diseña de manera que el medio de cultivo celular bombeado a través del extremo del cartucho circule a través del interior de la fibra. Las células están unidas a un soporte poroso y los cultivos se pueden mantener
40 durante muchos meses de producción continua.

El análisis de las células en expansión / expandidas puede incluir la expresión de marcadores tales como aquellos descritos en la presente solicitud. Además, se puede analizar la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos, tales como CD34 y CD45. El sobrenadante de muestra y las monocapas pueden ser
45 periódicamente monitorizados para (a) morfología celular, (b) ploidía y (c) hibridación *in situ* para marcadores celulares.

Como se indica anteriormente, las células que se expanden en el biorreactor se pueden primero aislar y cultivar usando otras condiciones de cultivo. Por ejemplo, las células ejemplificadas (designadas "MAPC") se pueden
50 primero aislar y cultivar como se describe en el presente documento más adelante.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 proporciona una ilustración esquemática de un sistema de expansión de células de fibra hueca.

La Figura 2 es una vista esquemática de un biorreactor que se puede usar en la presente invención.

60 La Figura 3A representa una vista lateral de una realización de la cámara de crecimiento celular de fibra hueca de una cámara de crecimiento celular. La Figura 3B representa una vista lateral en sección de la cámara de crecimiento celular de fibra hueca de la realización de la Figura 3A.

Figura 4 – Un circuito de fluido del sistema de expansión celular (CES) que muestra el sistema en diagrama de bloques y todas las conexiones de bolsas.

65 Figura 5 – Esquema de flujo para el sistema de expansión celular Quantum de Caridian BCT (ahora propiedad de Terumo) usado para expandir MultiStem de médula ósea o de bancos de células.

Figura 6 – Se sembró un aspirado de médula ósea completo en Quantum sin selección previa de las células mononucleares de la médula ósea (BMMNC) y se sembraron BMMNC del mismo donante en plástico de cultivo celular regular. Esto se hizo para 3 donantes independientes. Se sometieron a pases células en T75 al menos 3 veces y se contaron los números de células para calcular la duplicación de poblaciones (PD). Se recogieron las células en Quantum, se contaron, se cargaron en un nuevo biorreactor y se recogieron otra vez 6 días después. La tasa de expansión para MultiStem a partir de un aspirado de médula ósea en Quantum no es significativamente diferente de la expansión sobre plástico de cultivo celular.

Figura 7 – A partir de un aspirado de médula ósea, es posible crear un banco de células maestras MultiStem en el plazo de 17 días.

Figura 8 – Esquema más detallado del aparato de la Figura 5.

Figura 9 – Visión general de una realización de expansión con el biorreactor de fibra hueca de sistema cerrado, de perfusión continua.

Figura 10 – Visión general del proceso de producción, desde el aislamiento de las células de un donante aceptado hasta la creación de un banco de células maestras, y luego administración de las células a un paciente.

Figura 11 – Esquema del enfoque del banco de células.

Descripción detallada de la invención

Se debe entender que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos, etc., descritos en el presente documento y, como tales, pueden variar. La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir realizaciones particulares solo, y no pretende limitar el alcance de la invención desvelada, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Los encabezados de sección se usan en el presente documento para fines organizativos solo y no se deben interpretar de ningún modo como limitantes de la materia descrita.

Los métodos y técnicas de la presente solicitud, en general, se realizan según métodos convencionales muy conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se tratan en toda la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Definiciones

"Un" o "una" significa en el presente documento uno o más de uno; al menos uno. Donde la forma en plural se usa en el presente documento, en general, incluye el singular.

El término "biorreactor" se refiere a un sistema de cultivo celular que proporciona nutrientes a células y retira metabolitos, así como proporciona un entorno fisicoquímico propicio para el crecimiento celular, en un sistema estéril cerrado.

Como se usa en el presente documento, el término "biorreactor" se refiere a cualquier dispositivo en el que se desarrollen procesos biológicos y/o bioquímicos en condiciones medioambientales y de operación monitorizadas y controladas, por ejemplo, pH, temperatura, presión, suministro de nutrientes y retirada de residuos. Según la invención, la clase básica de biorreactores adecuados para su uso con la presente invención incluye biorreactores de fibra hueca.

Un "banco de células" es la nomenclatura de la industria para células que han sido cultivadas y almacenadas para uso futuro. Las células se pueden almacenar en alícuotas. Se pueden usar directamente fuera de almacenamiento o se pueden expandir después del almacenamiento. Esto es una ventaja de manera que existen células "fuera del estante" disponibles para administración. Las células ya se pueden almacenar en un excipiente farmacéuticamente aceptable, de manera que se pueden administrar directamente o se pueden mezclar con un excipiente apropiado cuando son sacadas del almacenamiento. Las células se pueden congelar o almacenar de otro modo en una forma para conservar la viabilidad. En una realización de la invención, se crean bancos de células en los que las células se han seleccionado para la modulación potenciada de la activación de macrófagos. Tras sacarlas del almacenamiento, y antes de la administración al sujeto, puede ser preferible ensayar otra vez las células para potencia, es decir, nivel de modulación de la activación de macrófagos. Esto se puede hacer usando cualquiera de los ensayos, directos o indirectos, descritos en la presente solicitud o conocidos de otro modo en la técnica. Entonces, las células que tienen

la potencia deseada se pueden administrar al sujeto para el tratamiento. Se pueden preparar bancos usando células derivadas del individuo que se va a tratar (de sus tejidos prenatales tales como placenta, sangre del cordón umbilical, o matriz del cordón umbilical, o expandidas del individuo en cualquier momento después del nacimiento) (autólogo). O los bancos pueden contener células para usos alógenos. Un banco de células maestro es un depósito de células para proporcionar una alícuota de células que puede ser adicionalmente expandida para proporcionar dosis para administración a un sujeto.

Un número "clínicamente relevante" de células se refiere a varias células que son suficientes para efectuar una respuesta clínica; es decir, una prevención, reducción, mejora, etc., de una afección patológica no deseable en un sujeto. Una realización particular se refiere a varias células que son suficientes para crear un banco de células maestras.

"Co-administrar" significa administrar conjuntamente con otros, juntos, coordinadamente, que incluye administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

"Que comprende" significa, sin otra limitación, que incluyen el referente, necesariamente, sin ninguna cualificación o exclusión sobre qué más se puede incluir. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" engloba cualquier composición que contenga x e y, sin importar qué otros componentes puedan estar presentes en la composición. Asimismo, "un método que comprende la etapa de x" engloba cualquier método en el que x se lleva a cabo, si x es la única etapa en el método, o es solo una de las etapas, sin importar cuántas otras etapas pueda haber y sin importar cómo de simple y complejo es x en comparación con ellos. "Comprende" y expresiones similares usando palabras de la raíz "comprender" se usan en el presente documento como sinónimo de "que comprende" y tienen el mismo significado.

"Comprendido de" es un sinónimo de "que comprende" (véase anteriormente).

"Medio de cultivo celular acondicionado" es un término muy conocido en la técnica y se refiere al medio en el que han crecido las células. En el presente documento, esto significa que las células se cultivan durante un tiempo suficiente para secretar los factores que son eficaces para lograr cualquiera de los resultados descritos en la presente solicitud.

Medio de cultivo celular acondicionado se refiere a medio en el que las células se han cultivado para secretar factores en el medio. Para los fines de la presente invención, las células se pueden cultivar a través de un número suficiente de divisiones celulares para producir cantidades eficaces de dichos factores, de manera que el medio tenga los efectos. Las células se retiran del medio por cualquiera de los métodos conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, inmunodepleción (por ejemplo, mediante anticuerpos marcados y columnas magnéticas), y clasificación FACS.

Las "células EC" fueron descubiertas del análisis de un tipo de cáncer denominado un teratocarcinoma. En 1964, los investigadores observaron que una única célula en los teratocarcinomas se podía aislar y seguía sin diferenciar en cultivo. Este tipo de célula madre llegó a ser conocida como una célula de carcinoma embrionario (células EC).

"Cantidad eficaz", en general, significa una cantidad que proporciona el efecto local y sistémico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. Las cantidades eficaces se pueden proporcionar todas de una vez en una única administración, o en cantidades fraccionadas que proporcionan la cantidad eficaz en varias administraciones. La determinación precisa de lo que se consideraría una cantidad eficaz se puede basar en factores individuales para cada sujeto, que incluyen su tamaño, edad, lesión, y/o enfermedad o lesión que está tratándose, y cantidad de tiempo desde que ocurrió la lesión o empezó la enfermedad. Un experto en la técnica será capaz de determinar la cantidad eficaz para un sujeto dado basándose en estas consideraciones que son rutinarias en la materia. Como se usa en el presente documento, "dosis eficaz" significa lo mismo que "cantidad eficaz".

"Vía eficaz" significa, en general, una vía que proporciona la administración de un agente a un compartimento, sistema, o localización deseada. Por ejemplo, una vía eficaz es una a través de la cual se puede administrar un agente para proporcionar en el sitio de acción deseado una cantidad del agente suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado.

Se conocen bien en la técnica las "células madre embrionarias (ESC)" y se han preparado a partir de muchas especies diferentes de mamífero. Las células madre embrionarias son células madre derivadas de la masa celular interna de un embrión de estado temprano conocido como un blastocisto. Son capaces de diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estos incluyen cada uno de los más de 220 tipos de células en el cuerpo adulto. Las células ES se pueden convertir en cualquier tejido en el cuerpo, excluyendo la placenta. Solo las células de la mórula son totipotentes, capaces de convertirse en todos los tejidos y en placenta. Algunas células similares a ESCs se pueden producir por transferencia nuclear de un núcleo de células somáticas en un óvulo fecundado enucleado.

"Expandir" significa lograr un número clínicamente relevante de divisiones celulares de la célula de salida. "Clínicamente relevante" significa que se logran suficientes duplicaciones de las células de estas células en y/o sobre las fibras para proporcionar números clínicamente relevantes de las células de salida. Se ha usado la tecnología de biorreactores de fibra hueca para fines distintos de la expansión real de células que produce números clínicamente relevantes de células de salida. Por ejemplo, dichos biorreactores se han usado para diferenciar una población de entrada de células, para concentrar una población de entrada de células, para tratar sangre y otros fluidos por medio de una población de entrada de células, y similares. En estas realizaciones, las células asociadas a las fibras no son en realidad células de salida. Se adhieren a las fibras, no de manera que se expandirán, sino para un fin diferente. Sin embargo, en los marcos de tiempo usados para lograr estos otros fines, algunas de las células de entrada pueden, en realidad, expandirse. Lo que distingue esto de la presente aplicación de la tecnología es que la expansión de las células no se logra en números clínicamente relevantes. La duplicación de células es limitada.

El término "fibra hueca" pretende incluir estructuras huecas (de cualquier forma) que contienen poros de tamaño, forma y densidad definida para su uso en suministrar nutrientes (en disolución) a células contenidas dentro de un biorreactor y para la retirada de materiales residuales (en disolución) de células contenidas dentro de un biorreactor. Para los fines de la presente invención, las fibras huecas se pueden construir de un material resorbible o no resorbible. Las fibras incluyen, pero no se limitan a, estructuras tubulares.

El uso del término "incluye" no pretende ser limitante.

"Aumento" o "aumentar" significa inducir completamente donde no hubo presencia preexistente o aumentar el grado de.

"Células madre pluripotentes inducidas (células IPSC o IPS)" son células somáticas que se han reprogramado, por ejemplo, introduciendo genes exógenos que confieren sobre la célula somática un fenotipo menos diferenciado. Estas células se pueden inducir entonces para diferenciarse en progenie menos diferenciada. Se han obtenido células IPS usando modificaciones de un enfoque originalmente descubierto en 2006 (Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)). Por ejemplo, en un caso, para crear células IPS, los científicos empezaron con células de piel que luego se modificaron por una técnica de laboratorio convencional usando retrovirus para insertar genes en el ADN celular. En un caso, los genes insertados fueron Oct4, Sox2, Lf4 y c-myc, que se sabe que actúan juntos como reguladores naturales para mantener las células en un estado de tipo célula madre embrionaria. Estas células se han descrito en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Wemig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008); Jaenisch et al., Cell, 132:567-582 (2008); Hanna et al., Cell, 133:250-264 (2008); y Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2:151-159 (2008). Estas referencias enseñan IPSCs y métodos para producirlas. También es posible que dichas células se puedan crear por condiciones de cultivo específicas (exposición a agentes específicos).

La "población de células de entrada" se refiere al tipo de célula introducida en el biorreactor para la expansión de ese tipo de célula y que, por último lugar, formará la población de células de salida. La población de células de entrada se puede introducir en el biorreactor en números muy pequeños. Por ejemplo, en médula ósea, la población de células de entrada deseada se puede encontrar originalmente en números de células de tan solo una en un millón. Alternativamente, la población de entrada puede ser sustancialmente homogénea, tal como obtenida de un banco de células y expandida adicionalmente en el biorreactor.

El término "aislada" se refiere a una célula o células que no están asociadas a una o más células o uno o más componentes celulares que están asociados con la célula o células *in vivo*. Una "población enriquecida" significa un aumento relativo en los números de una célula deseada con respecto a uno o varios de otros tipos de células *in vivo* o en cultivo primario.

Sin embargo, como se usa en el presente documento, el término "aislada" no indica la presencia de solo células madre. Más bien, el término "aislada" indica que las células se retiran de su entorno de tejido natural y están presentes a una concentración más alta en comparación con el entorno de tejido normal. Por consiguiente, una población de células "aisladas" puede incluir además tipos de células, además de células madre, y puede incluir componentes de tejido adicionales. Esto también se puede expresar en términos de duplicaciones de células, por ejemplo. Una célula puede experimentar 10, 20, 30, 40 o más duplicaciones *in vitro* o *ex vivo* de manera que se enriquezca en comparación con sus números originales *in vivo* o en su entorno de tejido original (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica, tejido adiposo, etc.).

"MAPC" es un acrónimo de "célula progenitora adulta multipotente". Se refiere a una célula que no es una célula madre embrionaria o célula germinativa, pero tiene ciertas características de estas. Las MAPC se pueden caracterizar en varias descripciones alternativas, cada una de las cuales confirió novedad a las células cuando se descubrieron. Se pueden caracterizar, por tanto, por una o más de las descripciones. Primero, tienen capacidad replicativa prolongada en cultivo sin ser transformadas (tumorigénicas) y con un cariotipo normal. Segundo, pueden dar lugar a progenie celular de más de una capa germinal, tal como dos o las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) tras la diferenciación. Tercero, aunque no son células madre embrionarias o células germinativas, pueden expresar marcadores de estos tipos primitivos de células de manera que las MAPCs

5 puedan expresar uno o más de Oct 3/4 (es decir, Oct 3A), rex-1 y rox-1. También pueden expresar uno o más de sox-2 y SSEA-4. Cuarto, como una célula madre, se pueden auto-renovar, es decir, tienen una capacidad de replicación prolongada sin ser transformadas. Esto significa que estas células expresan telomerasa (es decir, tienen actividad de telomerasa). Por consiguiente, el tipo de célula que se designó "MAPC" se puede caracterizar por características básicas alternativas que describen la célula por algunas de sus propiedades novedosas.

10 El término "adulto" en MAPC es no restrictivo. Se refiere a una célula somática no embrionaria. Las MAPCs son cariotípicamente normales y no forman teratomas *in vivo*. Este acrónimo se usó por primera vez en la patente de EE. UU. N° 7.015.037 para describir una célula aislada pluripotente de médula ósea. Sin embargo, posteriormente se han descubierto células con marcadores pluripotenciales y/o potencial de diferenciación y, para los fines de la presente invención, pueden ser equivalentes a las células designadas por primera vez "MAPC." Las descripciones esenciales del tipo MAPC de célula se proporcionan en el Sumario de la invención anteriormente.

15 MAPC representa una población de células progenitoras más primitiva que MSC (Verfaillie, C.M., Trends Cell Biol 12:502-8 (2002), Jahagirdar, B.N., et al., Exp Hematol, 29:543-56 (2001); Reyes, M. y C.M. Verfaillie, Ann N Y Acad Sci, 938:231-233 (2001); Jiang, Y. et al., Exp Hematol, 30:896-904 (2002); y (Jiang, Y. et al., Nature, 418:41-9. (2002)).

20 El término "MultiStem®" es el nombre comercial de una preparación de células basada en las MAPCs de la patente de EE. UU. N° 7.015.037, es decir, una célula madre no embrionaria no germinativa como se ha descrito anteriormente. MultiStem® se prepara según los métodos de cultivo celular desvelados en la presente solicitud de patente, particularmente, menor oxígeno y mayor suero. MultiStem® es altamente expansible, cariotípicamente normal, y no forma teratomas *in vivo*. Se puede diferenciar en linajes celulares de más de una capa germinal y puede expresar uno o más de telomerasa, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2 y SSEA4.

25 El término "disolución nutritiva" pretende incluir disoluciones que entran en un biorreactor y que contienen aquellos materiales nutrientes para el cultivo de células de mamífero o de vertebrado. Las disoluciones nutritivas también pueden contener aditivos que afectan cambios específicos en el fenotipo de las células en cultivo o contribuyen a cambios en la estructura de matriz del hueso recién formado que se forma, tal como mineralización.

30 Los nutrientes se administran a las células en el biorreactor y pueden afectar el crecimiento y la diferenciación de las células contenidas en el biorreactor. Las disoluciones nutritivas se seleccionan para proporcionar nutrición suficiente a las células para mantener la viabilidad, crecimiento y/o diferenciación en el biorreactor. Los expertos en la técnica son capaces de seleccionar una disolución nutritiva apropiada para la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar medios tales como medio Eagle modificado por Dulbecco y pueden ser además complementados con otros nutrientes adecuados. Otros nutrientes adecuados incluyen suero bovino fetal, 2-fosfato de ácido L-ascórbico, antibióticos, moduladores celulares tales como dexametasona, beta-glicerolfosfato, glucosa, glutamina, suplementos de aminoácidos, inhibidores (o activadores) de la apoptosis tales como éster etílico de glutatión, antioxidantes, inhibidores de caspasas, y cationes y aniones, por ejemplo, iones magnesio, manganeso, calcio, fosfato, cloruro, sodio, potasio, cinc y sulfato, y nitros y nitritos. La restante concentración de componentes en la disolución nutritiva debe ser suficiente para promover el crecimiento en el biorreactor y mantener la viabilidad de las células.

35 40 La "población de salida de células" se refiere a las células que se desea recoger del biorreactor después de que se hayan expandido en el biorreactor. Las células recogidas se definen como las que se retiran del biorreactor que entonces se usarán en la clínica o para otros fines, por ejemplo, investigación, ensayos clínicos, y similares.

45 Se pueden cultivar y estimular "células germinativas embrionarias primordiales" (células PG o EG) para producir muchos tipos menos diferenciados de células.

50 55 Las "células progenitoras" son células producidas durante la diferenciación de una célula madre que tiene algunas, pero no todas, las características de su progenie terminalmente diferenciada. Las células progenitoras definidas, tales como "células progenitoras cardíacas", están comprometidas a un linaje, pero no a un tipo específico o terminalmente diferenciado de célula. El término "progenitor", como se usa en el acrónimo "MAPC", no limita estas células a un linaje particular. Una célula progenitora puede formar una célula de progenie que está más altamente diferenciada que la célula progenitora.

60 La selección podría ser de células en un tejido. Por ejemplo, en este caso, las células se aislarían de un tejido deseado, se expandirían en cultivo, se seleccionarían para característica deseada, y se expandirían adicionalmente las células seleccionadas.

"Auto-renovación" se refiere a la capacidad para producir células madre hijas replicadas que tienen el potencial de diferenciación que es idéntico a aquél del que surgen. Un término similar usado en este contexto es "proliferación".

65 "Medio sin suero" se refiere a medio en el que el suero no está presente o, si está presente, es a niveles a los que los componentes del suero no tienen efecto sobre el crecimiento o la variabilidad de las células (es decir, no son en realidad necesarios, tales como cantidades residuales o traza).

"Célula madre" significa una célula que puede experimentar auto-renovación (es decir, progenie con el mismo potencial de diferenciación) y también producir células de progenie que están más restringidas en el potencial de diferenciación. Dentro del contexto de la invención, una célula madre también englobaría una célula más diferenciada que se ha desdiferenciado, por ejemplo, por transferencia nuclear, por fusión con una célula madre más primitiva, por introducción de factores de transcripción específicos, o por cultivo en condiciones específicas. Véanse, por ejemplo, Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997); Ying et al., *Nature*, 416:545-548 (2002); Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006); Takahashi et al., *Cell*, 126:663-676 (2006); Okita et al., *Nature*, 448:313-317 (2007); y Takahashi et al., *Cell*, 131:861-872 (2007).

La desdiferenciación también se puede provocar por la administración de ciertos compuestos o la exposición a un entorno físico *in vitro* o *in vivo* que provocaría la desdiferenciación. Las células madre también se pueden obtener de tejido anormal, tal como un teratocarcinoma y algunas otras fuentes tales como cuerpos embrioides (aunque estos se pueden considerar células madre embrionarias en los que se obtienen de tejido embrionario, aunque no directamente de la masa celular interna). Las células madre también se pueden producir introduciendo genes asociados a la función de células madre en una célula no madre, tal como una célula madre pluripotente inducida.

"Sujeto" significa un vertebrado, tal como un mamífero, tal como un humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas y cerdos.

El término "disolución residual" pretende incluir disoluciones que salen de un biorreactor y que contienen subproductos residuales del metabolismo celular. Las concentraciones de subproductos residuales, por ejemplo amoníaco, ácido láctico, etc., y los niveles residuales de nutrientes tales como glucosa, en la disolución residual se pueden usar para evaluar los niveles de actividad metabólica de células que se cultivan en un biorreactor.

Biorreactores

Se conocen bien los biorreactores, especialmente los biorreactores usados para los procesos de regeneración de tejido. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente U.S. 6.306.169; 6.197.575; 6.080.581; 5.677.355; 5.433.909; 5.898.040.

Un biorreactor es un término generalizado que cubre esencialmente cualquier tipo de recipiente que es capaz de incubar células, mientras que proporciona un grado de protección para el entorno celular. Un biorreactor puede ser un recipiente estático, tal como un matraz o bolsa de cultivo en el que las variables (tales como la composición de medios de crecimiento, concentración de oxígeno, niveles de pH y osmolaridad) no son completamente controladas y monitorizadas. Por otra parte, existen biorreactores electromecánicos del estado de la técnica completamente automatizados en los que todas las variables se monitorizan y son controlables. Un experto habitual en la biotecnología celular conoce bien muchas inter-combinaciones entre estos.

Se han descrito en la bibliografía tres enfoques tradicionales diferentes para el cultivo de células madre o progenitoras hematopoyéticas aisladas: el cultivo estático, con agitación y el inmovilizado. El cultivo estático tiene lugar en sistemas de cultivo muy simples tales como placas de pocillos, matraces de cultivo de tejido, o bolsas de cultivo permeables al gas. Como los dos primeros sistemas no permiten el cultivo de células a escala clínica, el último es en realidad la técnica más frecuentemente usada para la expansión de células madre (Purdy et al., *J Hematother*, 4:515-525 (1995); McNiece et al., *Hematol Cell Ther*, 4:82-86 (1999); y McNiece et al., *Exp Hematol*, 28:1181-1186 (2000a)). Todos estos sistemas tienen la ventaja de ser fáciles de manejar, dispositivos de un solo uso, que permiten una recogida de célula sin complicaciones. Sin embargo, con todos estos sistemas, la modulación del control de proceso se efectúa mediante el control del entorno de la estufa de incubación, y no existe provisión de alimentación continua. Así, variaciones en las condiciones de cultivo durante el cultivo (por ejemplo, tensión del oxígeno, pH, sustrato, metabolito y concentraciones de citocina) son factores críticos en los tres métodos de cultivo estático.

Los biorreactores con agitación se usan comúnmente en el cultivo de células de animal, ofreciendo un entorno homogéneo, muestreo representativo, mejor acceso al control de proceso y un aumento de la transferencia de oxígeno. Se han implementado satisfactoriamente varias de las técnicas con agitación (matraces de agitación y biorreactores de recipiente con agitación) en el cultivo de células hematopoyéticas (Zandstra et al., *Biotechnol*, 12:909-914 (1994)).

La inmovilización de células madre y progenitoras es un intento por alcanzar altas densidades celulares locales y por imitar la estructura tridimensional del tejido (tal como médula ósea) sin el uso de capa alimentadora del estroma. En reactores de biocatalizador inmovilizado, las células se pueden inmovilizar en o sobre un vehículo, inmovilizadas por enlace entre sí para formar partículas más grandes o confinadas dentro de barreras de membrana. La mayoría de los reactores pueden ser operados en un modo discontinuo, de lotes alimentos, o continuo. Se conocen bien en la técnica los biorreactores inmovilizados, tales como los reactores convencionales tales como reactores de tanque agitado continuos (CSTR) y reactores de lecho relleno (PBR) como se describen en los libros de texto convencionales tales como Ullmann's Encyclopedia Of Industrial Chemistry: Quinta Edición, T. Campbell, R.

Pfefferkorn y J. F. Rounsaville Eds, VCH Publishers 1985, Vol A4, pp 141-170; Ullmann's Encyclopedia Of Industrial Chemistry: Quinta ed., B. Elvers, S. Hawkins y G. Schulz Eds, VCH Publishers, 1992, Vol B4, pp 381-433; J. B. Butt "Reaction Kinetics And Reactor Design" Prentice-Hall, Inc., 1980, pp 185-241.

5 Así, los biorreactores se pueden agrupar según categorías generales que incluyen: biorreactores estáticos, biorreactores de matraz agitado, biorreactores con recipientes de pared giratoria, biorreactores de fibra hueca y biorreactores de perfusión directa. Dentro de los biorreactores, las células pueden estar libres, o inmovilizadas, sembradas sobre armazones tridimensionales porosos (hidrogel).

10 Los biorreactores de fibra hueca se pueden usar para potenciar la transferencia de masa durante el cultivo. Así, para la presente invención, el biorreactor es un biorreactor de fibra hueca. Los biorreactores de fibra hueca pueden tener las células madre y/o progenitoras incorporadas dentro de la luz de las fibras, perfundiendo el medio el espacio extraluminal, alternativamente, se puede proporcionar la perfusión de gas y medio a través de las fibras huecas, creciendo las células dentro del espacio extraluminal. Dichos biorreactores de fibra hueca adecuados para la
15 presente invención se han desvelado como se describe en el presente documento, y algunos están comercialmente disponibles, tales como el sistema de expansión de células BCT Quantum de Caridian (Terumo).

Un biorreactor se define como cualquier dispositivo que proporciona los requisitos fisiológicos de la célula (por ejemplo, pH, temperatura, presión, nutrientes, suministro y retirada de residuos) para la producción convencional de
20 células y sus productos. Un biorreactor puede potenciar el transporte de masa en biorreactores de ingeniería para la proliferación celular. Existe nutrición continua de células y retirada de productos residuales. Para la administración autóloga de células, un biorreactor debe ser relativamente compacto, desechable y económico. En general, se requiere una gran relación cámara/volumen. Finalmente, para mantener las células en un estado de diferenciación específico, se pueden requerir factores de crecimiento o componentes del suero y, así, se desea un biorreactor
25 portador de medio. Estos requisitos se cumplen por el sistema de expansión celular basado en el biorreactor de fibra hueca descrito en Antwiler et al.

En el aparato descrito en Antwiler et al., el sistema proporciona un volumen de crecimiento de cámara de alrededor
30 120 ml, aunque se pueden acomodar mayores volúmenes de cámara. Para el crecimiento, se proporciona un área superficial de 1,7 m². Así, se pueden cultivar tanto células adherentes como en suspensión en este dispositivo, que incluye cocultivos. Las otras características físicas son longitud, 295 mm; diámetro interno, 215 µm; volumen IC, 104 ml; volumen EC, 330 ml; número de fibras, 9000. Se puede usar fibronectina como recubrimiento para las células adherentes. El dispositivo puede mantener todas las condiciones experimentales requeridas para el
35 crecimiento de una célula de interés, tal como concentración de gas, pH, medio, temperatura, gestión de nutrientes, productos residuales y aditivos requeridos. Para prevenir la contaminación, el sistema se diseña con un compartimento de fluido estéril cerrado. Las bolsas de medios reactivos y las disoluciones siguen unidas al sistema de manera que los programas de alimentación, retirada de residuos y entorno de cultivo celular general se puedan sustituir, controlar y optimizar según se desee. La unidad se puede usar en la mesa. Las células se pueden cultivar dentro (intracapilar), fuera (extracapilar), o simultáneamente sobre ambas caras de las fibras. Este diseño de
40 biorreactor de fibra hueca permite la conexión directa usando tubería que se puede orientar a través de bombas peristálticas apropiadas, válvulas de pinzamiento, etc., para obtener un sistema cerrado. El control de gases se gestiona usando un oxigenador de fibra hueca. El sistema también acomoda la capacidad de añadir y recoger células, sustituir medio y añadir reactivos, etc. Así, se usan bolsas para todos los fluidos y las conexiones de bolsas usan todas tecnología de conexión estéril. La representación esquemática se encuentra en la Fig. 4.

45 En la realización ejemplificada en la presente solicitud (Ejemplo 1), el biorreactor de flujo continuo tiene un volumen de fluido interno de 184 ml y un volumen de fluido externo de 303 ml que contiene 1,1 x 10⁴ fibras huecas con un área superficial total (intracapilar) de aproximadamente 2,1 m² (3255 in²), un espesor de pared de 50 µm, diámetro interno de 215 µm, y longitud de 295 mm. El tamaño de poro tiene un corte de 16 kDa para el paso de componentes.

50 Las fibras huecas deben ser adecuadas para la administración de nutrientes y la retirada de residuos en el biorreactor. Las fibras huecas pueden ser de cualquier forma, por ejemplo, pueden ser redondas y tubulares o en forma de anillos concéntricos. Las fibras huecas pueden estar constituidas de membrana resorbible o no resorbible. Por ejemplo, los componentes adecuados de las fibras huecas incluyen polidioxanona, polilactida, poliglactina, ácido
55 poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico/carbonato de trimetileno, celulosa, metilcelulosa, polímeros celulósicos, éster de celulosa, celulosa regenerada, pluronic, colágeno, elastina, y mezclas de los mismos. La gran variedad de materiales adecuados es muy conocida en la técnica y se representa por un gran conjunto de bibliografía. Los ejemplos de estos materiales se han descrito en las patentes de EE. UU. 4.220.725; 4.184.922; 4.200.689; 3.821.087; 3.883.393; 4.184.922; 4.200.689; 3.997.396; 4.220.725; 4.999.298; 4.804.628; 5.126.238; 5.656.421; 5.162.225; 5.622.857; 5.627.070; 6.001.585; 6.911.201; 6.933.144; 7.534.609; y las publicaciones de
60 EE. UU. 2007/0298497; 2008/0220523; 2001/0044413; 2009/0196901; 2010/0233130; 2009/0191631; 2005/0032218; 2005/0003530; 2003/0224510; 2006/0205071; 2010/0267134; 2008/0206733; 2010/0209403. 2008/0213894; 2008/0220522; 2008/0227190; 2008/0248572; 2008/0254533; 2010/0144037; y 2010/0042260. Los criterios para los materiales de pared incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: no tóxicos para las células; porosos para la retirada de residuos y la recepción de nutrientes y, en casos donde se desee la recogida de componentes secretados por la célula, la porosidad se ajusta para ese parámetro; relativamente insensibles a

cambios de temperatura, es decir, térmicamente estables; capaces de retener la integridad de forma.

También se conoce que dichos materiales son impermeables a las células, pero permeables a una variedad de materiales deseados. Así, las fibras huecas incluyen poros para permitir que los nutrientes y los residuos entren y salgan de ellas. Los poros de las fibras huecas son de un diámetro suficiente para permitir la difusión de una molécula desde un lado de la fibra hueca hasta el otro lado de la fibra hueca. Preferentemente, las moléculas que pueden pasar a través de los poros de la fibra hueca son de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 50 kDa, más preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 25 kDa, o lo más preferentemente aproximadamente 2 a aproximadamente 16 kDa. Por consiguiente, el tamaño de poro de las paredes de la fibra se puede variar dependiendo de los componentes que se desee que pasen a través de las paredes. Por ejemplo, el tamaño de poro puede permitir solo moléculas pequeñas o, quizás, grandes para permitir el paso de grandes moléculas proteínicas, que incluyen factores de crecimiento, que incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento derivado de plaquetas. El experto habitual en la materia entendería cómo variar el tamaño de poros dependiendo de los componentes que se desea que pasen a través de las paredes de fibra para llegar a las células o para llevar material desde las células. Por ejemplo, puede ser deseable recoger componentes que son producidos por las células para uso adicional. Las células, por ejemplo, pueden expresar y secretar citocinas, factores de crecimiento, factores inmunomoduladores, y otros componentes que son además útiles. Los materiales que pueden ser llevados desde las células también incluyen productos residuales que se desean retirar de la célula. Por consiguiente, esta tecnología se podría usar para producir medio acondicionado por las células que contiene componentes útiles.

Existen varias configuraciones de biorreactor para cultivar células dependientes del anclaje, tales como las de la invención. Pero la presente invención no depende de ninguna configuración particular. Un ejemplo se proporciona en la publicación de EE. UU. N° 2007/0298497, que desvela una configuración que se ha usado para cultivar células madre mesenquimatosas.

Un ejemplo, en el documento de patente U.S. 2007/0298497 (que no pretende ser limitante), es un biorreactor de fibra hueca mostrado en la Figura 2. Un módulo de expansión de células o biorreactor 10 que se puede usar en la presente invención está fabricado de un haz de membranas de fibra hueca 12 encerradas dentro de una carcasa 14. El haz de fibras huecas se denomina conjuntamente una membrana. La carcasa o módulo 14 puede ser de forma cilíndrica y se pueda fabricar de cualquier tipo de material polimérico biocompatible.

Cada extremo del módulo 14 está cerrado con tapas terminales o cabezales 16, 18. Las tapas terminales 16, 18 se pueden fabricar de cualquier material adecuado tal como policarbonato, mientras que el material sea biocompatible con las células a cultivar en el biorreactor.

Puede haber al menos cuatro puertos dentro y fuera del módulo. Dos puertos conectan de forma fluida con el espacio extracapilar (espacio EC), un puerto 34 para la entrada de medio extracapilar nuevo en el espacio que rodea las fibras huecas y un puerto 44 para la salida de medio extracapilar gastado fuera del módulo. Dos puertos también conectan de forma fluida con el espacio intracapilar (espacio IC), un puerto 26 para la entrada de medio intracapilar nuevo en la luz de las fibras huecas, así como para la introducción de las células a expandir, y un puerto 42 para la salida de medio intracapilar gastado y la retirada de células expandidas del biorreactor.

Las células a expandir en el biorreactor pueden ser circuladas en el espacio IC o el espacio EC. El biorreactor se puede cargar con células usando una jeringa o las células se pueden distribuir en los espacios IC o EC directamente de un separador de células. Las células también se pueden introducir en el módulo de crecimiento o biorreactor de una bolsa de entrada de células o matraz (mostrado como el elemento 5) que puede ser acoplado de forma estéril al biorreactor.

En una realización, el material de pared de fibra hueca que se puede usar incluye, pero no se limita a, dos tipos, un 0,5 % de poliuretano termoplástico comercializado con el nombre comercial Desmopan.RTM. (disponible de Bayer Material Science AG, DE) y Polyflux.RTM., que es un nombre comercial para un dializador con una membrana de Polyamix.RTM (una mezcla de poliamida, poliariléter sulfona y polivinilpirrolidona) (disponible de Gambro Dialysatoren, GmbH, Hechingen, Del.) (Hoenich, et al. (2000) ASAIO J., 46:70-75).

El documento de patente U.S. 2008/0220523 proporciona un sistema de expansión celular y métodos para usarlo que, en una realización específica, son adecuados para cultivar las células descritas en el presente documento. El sistema de expansión de células incluye, en general, una cámara de crecimiento celular de fibra hueca y primer y segundo bucles de circulación (bucles intracapilares y bucles extracapilares) asociados al interior de las fibras huecas y al exterior de las fibras huecas, respectivamente. También se proporcionan circuitos de flujo desmontables y los métodos de expansión de las células. La cámara de crecimiento celular se describe a continuación y también se muestra en la Figura 3.

Cámara de crecimiento celular (documento de patente U.S. 2008/0220523)

La cámara de crecimiento celular del sistema de expansión de células incluye, en general, una membrana de fibras

huecas comprendida de una pluralidad de fibras huecas semipermeables que separan la primera y segunda trayectorias de circulación de fluido.

5 Una cámara de crecimiento celular a modo de ejemplo se representa en la Figura 3, que representa una vista lateral en sección de la cámara de crecimiento celular de fibra hueca 200. La cámara de crecimiento celular 200 está delimitada por la carcasa de la cámara de crecimiento celular 202. La carcasa de la cámara de crecimiento celular 202 incluye además cuatro aberturas, o puertos: puerto de entrada 204, puerto de salida 206, puerto de entrada 208, y puerto de salida 210.

10 El fluido en la primera trayectoria de circulación entra en la cámara de crecimiento celular 200 a través del puerto de entrada 204, entra y pasa a través del lado intracapilar de una pluralidad de fibras huecas (denominado en diversas realizaciones el lado intracapilar ("IC") o el "espacio IC" de una membrana de fibras huecas), y sale de la cámara de crecimiento celular 200 a través del puerto de salida 206. Se usan indistintamente los términos "fibra hueca", "capilar de fibra hueca" y "capilar". Una pluralidad de fibras huecas se denomina conjuntamente una "membrana". El fluido
15 en la segunda trayectoria de circulación circula en la cámara de crecimiento celular a través del puerto de entrada 208, se pone en contacto con el exterior de las fibras huecas (denominado el "lado EC" o "espacio EC" de la membrana), y sale de la cámara de crecimiento celular 200 por el puerto de salida 210. Las células pueden estar contenidas dentro de la primera trayectoria de circulación o segunda trayectoria de circulación, y pueden estar en cualquiera del lado IC o el lado EC de la membrana.

20 Aunque la carcasa de la cámara de crecimiento celular 202 se representa de forma cilíndrica, puede tener cualquier otra forma conocida en la técnica. La carcasa de la cámara de crecimiento celular 202 se puede fabricar de cualquier tipo de material polimérico biocompatible. Se pueden diferenciar en forma y tamaño diversas otras carcasas de la cámara de crecimiento celular.

25 Los expertos en la técnica reconocerán que el término "cámara de crecimiento celular" no implica que todas las células que se cultivan o expanden en un sistema de expansión celular se cultivan en la cámara de crecimiento celular. Las células adherentes se pueden adherir a membranas dispuestas en la cámara de crecimiento, o pueden crecer dentro de las tuberías asociadas. También se pueden cultivar células no adherentes (también denominadas "células en suspensión"). Las células se pueden cultivar en otras áreas dentro de la primera o segunda trayectoria de circulación de fluido.

30 Por ejemplo, los extremos de fibras huecas 212 pueden estar encapsulados en los lados de la cámara de crecimiento celular por un material de conexión (también denominado en el presente documento "encapsulamiento" o "material de encapsulamiento"). El encapsulamiento puede ser cualquier material adecuado para la unión de las fibras huecas 212, a condición de que el flujo de medios y células en las fibras huecas no sea obstruido y que el líquido que circula en la cámara de crecimiento celular a través del puerto IC de entrada circule solo en las fibras huecas. Los materiales de encapsulamiento a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, poliuretano u otros componentes de unión o adhesivos adecuados. En diversas realizaciones, las fibras huecas y el encapsulamiento se
35 pueden cortar perpendiculares al eje central de las fibras huecas en cada extremo para permitir el flujo de fluidos dentro y fuera del lado IC. Las tapas terminales 214 y 216 están dispuestas en el extremo de la cámara de crecimiento celular.

40 El fluido que entra en la cámara de crecimiento celular 200 por el puerto de entrada 208 está en contacto con el exterior de las fibras huecas. Esta porción de la cámara de crecimiento celular de fibra hueca se denomina el "espacio extracapilar (EC)". Las moléculas pequeñas (por ejemplo, agua, oxígeno, lactato, etc.) pueden difundir a través de las fibras huecas desde el interior de la fibra hueca hasta el espacio EC, o desde el espacio EC hasta el espacio IC. Las moléculas de gran peso molecular normalmente son demasiado grandes para pasar a través de las fibras huecas, y permanecen en el espacio IC de las fibras huecas. Los medios se pueden sustituir según se
45 necesite. Los medios también se pueden circular a través de un oxigenador para intercambiar gases según se necesite.

50 En diversas realizaciones, las células se pueden cargar en las fibras huecas por cualquiera de una variedad de métodos, que incluyen por jeringa. Las células también se pueden introducir en la cámara de crecimiento celular de un recipiente de fluido, tal como una bolsa, que se puede asociar de forma fluida a la cámara de crecimiento celular.

55 Las fibras huecas están configuradas para permitir que las células crezcan en el espacio intracapilar (es decir, dentro de la luz de la fibra hueca) de las fibras. Las fibras huecas son lo suficientemente grandes como para permitir la adhesión celular en la luz sin impedir sustancialmente el flujo de medio a través de la luz de la fibra hueca. En diversas realizaciones, el diámetro interno de la fibra hueca puede ser superior o igual a 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, o 100 micrómetros. Asimismo, el diámetro externo de la fibra hueca puede ser inferior o igual a 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 900, 800, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, o 100 micrómetros. El espesor de pared de la fibra hueca es suficiente para permitir la difusión de moléculas
60 pequeñas.

65

Se puede usar cualquier número de fibras huecas en una cámara de crecimiento celular, siempre que las fibras huecas se puedan asociar de forma fluida a los puertos de entrada y de salida de la cámara de crecimiento celular. En diversas realizaciones, la cámara de crecimiento celular puede incluir varias fibras huecas superiores o iguales a 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000 o 12000. En otras realizaciones, la cámara de crecimiento celular puede incluir varias fibras huecas inferiores o iguales a 12000, 11000, 10000, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, o 2000. En otras diversas realizaciones, la longitud de las fibras huecas puede ser superior o igual a 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, o 900 milímetros. En ciertas realizaciones, la cámara de crecimiento celular contiene aproximadamente 9000 fibras huecas que tienen una longitud promedio de 295 mm, un diámetro interno promedio de 215 micrómetros, y un diámetro externo promedio de 315 micrómetros.

Las fibras huecas se pueden construir de cualquier material capaz de formar un tamaño suficiente para formar fibras capaces de transportar líquido del puerto de entrada de la cámara de crecimiento celular al puerto de salida de la cámara de crecimiento celular. En diversas realizaciones, las fibras huecas se pueden construir de materiales adherentes plásticos capaces de unirse a ciertos tipos de células, tales como células madre adherentes. En diversas otras realizaciones, las fibras huecas se pueden tratar con compuestos tales como fibronectina para formar superficies adherentes.

En ciertas realizaciones, las fibras huecas se pueden fabricar de un material polimérico biocompatible semipermeable. Dicho material polimérico que se puede usar es una mezcla de poliamida, poliarilétersulfona y polivinilpirrolidona ("PA/PAES/PVP"). La membrana semipermeable permite la transferencia de nutrientes, gases residuales y disueltos a través de la membrana entre el espacio EC y el espacio IC. En diversas realizaciones, las características de transferencia molecular de las membranas de fibra hueca se eligen para minimizar la pérdida de reactivos caros necesarios para el crecimiento celular, tales como factores de crecimiento, citocinas, etc., de la fibra hueca, mientras que permiten que los productos residuales metabólicos difundan a través de la membrana en el lado de la luz de fibra hueca a retirar.

En ciertas variaciones, una capa externa de cada fibra hueca PA/PAES/PVP se caracteriza por una estructura de poros homogénea y abierta con una rugosidad superficial definida. Las aberturas de los poros están en el intervalo de tamaño de 0,5-3 μm , y el número de poros sobre la superficie externa de las fibras está en el intervalo de 10.000 a 150.000 poros por mm^2 . Esta capa externa tiene un espesor de aproximadamente 1 a 10 μm . La siguiente capa en cada fibra hueca es una segunda capa que tiene la forma de una estructura de esponja y, en una realización adicional, un espesor de aproximadamente 1 a 15 μm . Esta segunda capa sirve de soporte para la capa externa. Una tercera capa a continuación de la segunda capa tiene la forma de estructura de tipo dedo. Esta tercera capa proporciona estabilidad mecánica y un alto volumen de vacío que da a la membrana una resistencia muy baja al transporte de moléculas a través de la membrana. Durante el uso, los vacíos de tipo dedo se llenan con fluido y el fluido da una menor resistencia por difusión y convección que una matriz con una estructura llena de esponja que tiene un menor volumen de vacíos. Esta tercera capa tiene un espesor de 20 a 60 μm .

En realizaciones adicionales, la membrana de fibra hueca puede incluir 65-95 % en peso de al menos un polímero hidrófobo y 5-35 % en peso de al menos un polímero hidrófilo. El polímero hidrófobo se puede elegir del grupo que consiste en poliamida (PA), poliarámid (PAA), poliarilétersulfona (PARS), poliétersulfona (PES), polisulfona (PSU), poliarilsulfona (PASU), policarbonato (PC), poliéter, poliuretano (PUR), poliéterimida, y mezclas de copolímeros de cualquiera de los polímeros anteriores, tales como poliétersulfona o una mezcla de poliarilétersulfona y poliamida. En realizaciones adicionales, el polímero hidrófilo se puede elegir del grupo que consiste en polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), monoéster de poliglicol, derivados celulósicos solubles en agua, polisorbato y copolímeros de polietileno-poli(óxido de propileno).

Dependiendo del tipo de células a expandir en el cámara de crecimiento celular, las fibras poliméricas se pueden tratar con una sustancia, tal como fibronectina, para potenciar el crecimiento celular y/o la adherencia de las células a la membrana.

Los documentos de patente U.S. 2008/0220523 y U.S. 2008/0248572 también tienen ejemplos de otras realizaciones de reactor detalladas, que incluye protocolos detallados de diagramas de flujo. Estas diversas realizaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en las Figuras 1B, 1C y 1D del documento de patente U.S. 2008/0220523. Los protocolos del diagrama de flujo se refieren a la Figura 1D. Cualquiera de estos sería adecuado para la práctica de la invención. Véanse también las realizaciones desveladas en el documento de patente U.S. 2008/0220522.

El documento de patente WO/2010/034468 proporciona otro dispositivo a modo de ejemplo que comprende dos compartimentos separados por una membrana semipermeable montada en una carcasa, un primer compartimento interno provisto de dos accesos y un segundo compartimento externo que comprende uno o dos accesos, estando también ambos compartimentos separados por un compuesto de encapsulamiento, basado en un compuesto adhesivo apropiado, previsto para formar según sea aplicable (i) una partición cilíndrica que separa ambos compartimentos de dicho dispositivo que contiene una membrana semi-permeable del tipo de haz de fibra hueca como se ha definido anteriormente o (ii) un sellado estanco en dicho dispositivo que incluye una membrana semipermeable del tipo membrana de hoja como se ha definido anteriormente.

Otro dispositivo a modo de ejemplo comprende una pluralidad de membranas de fibra hueca, contenidas dentro de una carcasa externa, y configuradas de manera que el fluido dentro de un espacio externo a las fibras huecas (es decir, un compartimento extracapilar) sea segregado del fluido que pasa a través de las fibras huecas y sus orificios correspondientes. Además, el dispositivo incluye dos cámaras terminales colectoras dentro de la carcasa externa en extremos opuestos del dispositivo. Cada uno de los dos orificios de una fibra hueca conecta con una cámara terminal diferente. Las cámaras terminales y el compartimento extracapilar se separan por las membranas semipermeables de las fibras huecas. La composición dentro del compartimento extracapilar se puede controlar, hasta un cierto grado, por el corte de peso molecular, o tamaño de poro, de las membranas de las fibras huecas.

En un modo de operación del dispositivo, las células se cultivan en el compartimento extracapilar, mientras que un medio nutritivo pasa a través de las fibras huecas. En otro modo de operación del dispositivo, las células se cultivan en el espacio intracapilar (es decir, luz) de las fibras huecas, mientras que un medio nutritivo pasa a través del compartimento extracapilar y/o el compartimento intracapilar. La naturaleza semipermeable de las fibras huecas permite que los nutrientes y productos residuales celulares pasen a través de las paredes de las fibras huecas mientras que bloquean que las células hagan lo mismo.

Los biorreactores de tipo carcasa y tubos proporcionan varias ventajas. Para células adherentes, el uso de varias fibras huecas proporciona, dentro de un volumen relativamente pequeño, una gran cantidad de área superficial sobre la que pueden crecer las células. Esta gran cantidad de área superficial también facilita la distribución localizada de medios nutritivos a las células en crecimiento y la fácil recogida de productos residuales de las células. Los biorreactores de tipo carcasa y tubos permiten el crecimiento de células a densidad mucho más alta que la que es posible con otros dispositivos de cultivo celular. Pueden soportar densidades celulares superiores a 10^8 células por mililitro, mientras que otros dispositivos de cultivo celular normalmente están limitados a densidades de alrededor 10^6 células por mililitro.

Células madre

La presente invención se puede poner en práctica, preferentemente, usando células madre de especies de vertebrado, tales como seres humanos, primates no humanos, animales domésticos, ganado, y otros mamíferos no humanos. Estas incluyen, pero no se limitan a, las células descritas a continuación.

Células madre embrionarias

La célula madre mejor estudiada es la célula madre embrionaria (ESC), ya que tiene potencial ilimitado de auto-renovación y de diferenciación multipotente. Estas células se obtienen de la masa celular interna del blastocisto o se pueden obtener de las células germinativas primordiales de un embrión tras la implantación (células germinativas embrionarias o células EG). Las células ES y EG se han obtenido, primero de ratón, y luego, de muchos animales diferentes, y más recientemente, también de primates no humanos y seres humanos. Cuando se introducen en blastocistos de ratón o blastocistos de otros animales, las ESCs pueden contribuir a todos los tejidos del animal. Las células ES y EG se pueden identificar por tinción positiva con anticuerpos contra SSEA1 (ratón) y SSEA4 (humano). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 5.453.357; 5.656.479; 5.670.372; 5.843.780; 5.874.301; 5.914.268; 6.110.739; 6.190.910; 6.200.806; 6.432.711; 6.436.701; 6.500.668; 6.703.279; 6.875.607; 7.029.913; 7.112.437; 7.145.057; 7.153.684; y 7.294.508, cada una de las cuales enseña las células madre embrionarias y los métodos de su preparación y expansión. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica las ESCs y los métodos de su aislamiento y expansión.

Se han identificado varios factores de transcripción y citocinas exógenas, que influyen en el estado de potencia de las células madre embrionarias *in vivo*. El primer factor de transcripción a describir que participa en la pluripotencia de células madre es Oct4. Oct4 pertenece a la familia POU (Pit-Oct-Unc) de factores de transcripción y es una proteína de unión a ADN que es capaz de activar la transcripción de genes, que contiene una secuencia octamérica llamada "el motivo de octámero dentro de la región promotora o potenciadora. Oct4 se expresa en el momento de la etapa de escisión del cigoto fecundado hasta que se forma el cilindro del óvulo. La función de Oct3/4 es reprimir los genes inductores de la diferenciación (es decir, FoxaD3, hCG) y activar genes que promueven la pluripotencia (FGF4, Utlf1, Rex1). Sox2, un miembro de los factores de transcripción de la caja del grupo de alta movilidad (HMG), coopera con Oct4 para activar la transcripción de genes expresados en la masa celular interna. Es esencial que la expresión de Oct3/4 en células madre embrionarias se mantenga entre ciertos niveles. La expresión en exceso o la regulación por disminución de >50 % del nivel de expresión de Oct4 alterará el destino de la célula madre embrionaria, con formación de endodermo/mesodermo o trofotodermo primitivo, respectivamente. *In vivo*, los embriones deficientes en Oct4 se desarrollan a la etapa de blastocisto, pero las células de la masa celular interna no son pluripotentes. En su lugar, se diferencia a lo largo del linaje extraembrionario del trofoblasto. Sall4, un factor de transcripción Spalt de mamífero, es un regulador de Oct4 aguas arriba, y es, por tanto, importante para mantener niveles apropiados de Oct4 durante las fases tempranas de la embriología. Cuando los niveles de Sall4 disminuyen por debajo de un cierto umbral, las células trofotodérmicas se expandirán ectópicamente en la masa celular interna. Otro factor de transcripción requerido para la pluripotencia es Nanog, llamado por la tribu céltica "Tir Nan Og": Tierra de la Juventud. *In vivo*, Nanog se expresa desde la etapa de la mórula compactada, se define posteriormente hasta

la masa celular interna, y se regula por disminución por la etapa de implantación. La regulación por disminución de Nanog puede ser importante para evitar una expansión incontrolada de células pluripotentes y para permitir la diferenciación multilínea durante la gastrulación. Embriones Nanog nulos, aislados en el día 5,5, consisten en un blastocisto desorganizado, que principalmente contiene endodermo extraembrionario y sin epiblasto discernible.

5

Células madre no embrionarias

Se han identificado células madre en la mayoría de los tejidos. Quizás la mejor caracterizada sea la célula madre hematopoyética (HSC). Las HSCs son células derivadas del mesodermo que se pueden purificar usando marcadores superficiales de células y características funcionales. Se han aislado de médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón, hígado fetal y saco vitelino. Inician la hematopoyesis y generan múltiples linajes hematopoyéticos. Cuando se trasplantan en animales letalmente irradiados, pueden repoblar el conjunto eritroide de neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y de células hematopoyéticas linfoides. También se pueden inducir para experimentar cierta división celular de auto-renovación. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 5.635.387; 5.460.964; 5.677.136; 5.750.397; 5.681.599; y 5.716.827. La patente de EE. UU. N° 5.192.553 informa de métodos para aislar células madre o progenitoras neonatales humanas o hematopoyéticas fetales. La patente de EE. UU. N° 5.716.827 informa de células hematopoyéticas humanas que son progenitores Thy-1⁺, y medios de crecimiento apropiados para regenerarlos *in vitro*. La patente de EE. UU. N° 5.635.387 informa de un método y dispositivo para cultivar células hematopoyéticas humanas y sus precursores. La patente de EE. UU. N° 6.015.554 describe un método de reconstitución de células linfoides y dendríticas humanas. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica HSCs y métodos de su aislamiento y expansión.

10

15

20

25

30

35

Otra célula madre que es muy conocida en la técnica es la célula madre neural (NSC). Estas células pueden proliferar *in vivo* y regenerar continuamente al menos algunas células neuronales. Cuando se cultivan *ex vivo*, se pueden inducir que proliferen células madre neurales, así como que se diferencien en diferentes tipos de neuronas y células de la glía. Cuando se trasplantan en el cerebro, las células madre neurales se pueden injertar y generan células neurales y de la glía. Véanse, por ejemplo, Gage F.H., *Science*, 287:1433-1438 (2000), Svendsen S.N. et al., *Brain Pathology*, 9:499-513 (1999), y Okabe S. et al., *Mech Development*, 59:89-102 (1996). El documento de patente U.S. 5.851.832 informa de células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral. El documento de patente U.S. 5.766.948 informa de la producción de neuroblastos de hemisferios cerebrales de recién nacidos. Los documentos de patente U.S. 5.564.183 y 5.849.553 informan del uso de células madre neurales de la cresta de mamífero. El documento de patente U.S. 6.040.180 informa de la generación *in vitro* de neuronas diferenciadas a partir de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamífero. Los documentos de patente WO 98/50526 y WO 99/01159 informan de la generación y el aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocitos-astrocitos, y precursores neuronales restringidos a linaje. El documento de patente U.S. 5.968.829 informa de células madre neurales obtenidas de prosencéfalo embrionario. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica las células madre neurales y los métodos de su preparación y expansión.

40

45

Otra célula madre que se ha estudiado ampliamente en la materia es la célula madre mesenquimatosa (MSC). Las MSCs se obtienen del mesodermo embrionario y se pueden aislar de muchas fuentes, que incluyen médula ósea adulta, sangre periférica, grasa, placenta y sangre umbilical, entre otros. Las MSCs se pueden diferenciar en muchos tejidos mesodérmicos, que incluyen músculo, hueso, cartílago, grasa y tendón. Existe bibliografía considerable sobre estas células. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente U.S. 5.486.389; 5.827.735; 5.811.094; 5.736.396; 5.837.539; 5.837.670; y 5.827.740. Véanse también Pittenger, M. et al, *Science*, 284:143-147 (1999).

50

Otro ejemplo de una célula madre adulta es las células madre adultas derivadas de adiposo (ADSCs) que han sido aisladas de grasa, normalmente por liposucción, seguido por liberación de las ADSCs usando colagenasa. Las ADSCs son similares de muchas formas a las MSCs obtenidas de médula ósea, excepto que es posible aislar muchas más células de la grasa. Se ha informado que estas células se diferencian en hueso, grasa, músculo, cartílago y neuronas. Se ha descrito un método de aislamiento en el documento de patente U.S. 2005/0153442.

55

Otras células madre que se conocen en la técnica incluyen células madre gastrointestinales, células madre epidérmicas y células madre hepáticas, que también se han denominado "células ovaladas" (Potten, C., et al., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:821-830 (1998), Watt, F., *Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353:831 (1997); Alison et al., *Hepatology*, 29:678-683 (1998).

60

65

Otras células no embrionarias que se ha informado que son capaces de diferenciarse en tipos de células de más de una capa germinal embrionaria incluyen, pero no se limitan a, células de la sangre del cordón umbilical (véase la publicación de EE. UU. N° 2002/0164794), placenta (véase la publicación de EE. UU. N° 2003/0181269, matriz del cordón umbilical (Mitchell, K.E. et al., *Stem Cells*, 21:50-60 (2003)), células madre pequeñas de tipo embrionarias (Kucia, M. et al., *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5:5-18 (2006)), células madre de líquido amniótico (Atala, A., *J Tissue Regen Med*, 1:83-96 (2007)), precursores derivados de la piel (Toma et al., *Nat Cell Biol*, 3:778-784 (2001)), y médula ósea (véanse las publicaciones de EE. UU. N° 2003/0059414 y 2006/0147246).

Estrategias de reprogramación de células somáticas

Se han empleado varias estrategias diferentes tales como trasplante nuclear, fusión celular y reprogramación inducida por cultivo para inducir la conversión de células diferenciadas en un estado embrionario. La transferencia nuclear implica la inyección de un núcleo somático en un ovocito enucleado que, tras la transferencia en una madre de alquiler, puede dar lugar a un clon ("clonación reproductiva") o, tras la explantación en cultivo, puede dar lugar a células madre embrionarias (ES) genéticamente correspondientes ("transferencia nuclear de células somáticas," SCNT). La fusión de células de células somáticas con células ES da como resultado la generación de híbridos que muestran todas las características de las células ES pluripotentes. La explantación de células somáticas en cultivo selecciona líneas celulares inmortales que pueden ser pluripotentes o multipotentes. Actualmente, las células madre espermatozonales son la única fuente de células pluripotentes que se pueden derivar de animales postnatales. La transducción de células somáticas con factores definidos puede iniciar la reprogramación a un estado pluripotente. Estos enfoques experimentales se han revisado ampliamente (Hochedlinger y Jaenisch, *Nature*, 441:1061-1067 (2006) y Yamanaka, S., *Cell Stem Cell*, 1:39-49 (2007)).

15 Transferencia nuclear

El trasplante nuclear (NT), también denominado transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), indica la introducción de un núcleo de una célula somática de donante en un ovocito enucleado para generar un animal clonado, tal como Dolly la oveja (Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997)). La generación de animales vivos por NT demostró que el estado epigenético de las células somáticas, que incluye el de células terminalmente diferenciadas, aunque es estable, no es fijo de forma irreversible, pero se puede reprogramar hasta un estado embrionario que es capaz de dirigir el desarrollo de un nuevo organismo. Además de proporcionar un excitante enfoque experimental para elucidar los mecanismos epigenéticos básicos implicados en el desarrollo embrionario y la enfermedad, la tecnología de clonación nuclear es de posible interés para la medicina de trasplantes específicos de paciente.

25 Fusión de células somáticas y células madre embrionarias

Se ha demostrado la reprogramación epigenética de núcleos somáticos hasta un estado no diferenciado en híbridos murinos producidos por fusión de células embrionarias con células somáticas. Los híbridos entre diversas células somáticas y células embrionarias de carcinoma (Solter, D., *Nat Rev Genet*, 7:319-327 (2006)), células terminales embrionarias (EG), o ES (Zwaka y Thomson, *Development*, 132:227-233 (2005)) comparten muchas características con las células embrionarias parentales, que indica que el fenotipo pluripotente es dominante en dichos productos de fusión. Como con las células ES de ratón (Tada et al., *Curr Biol*, 11:1553-1558 (2001)), las células ES humanas tienen el potencial de reprogramar núcleos somáticos después de la fusión (Cowan et al., *Science*, 309:1369-1373(2005)); Yu et al., *Science*, 318:1917-1920 (2006)). La activación de marcadores silenciosos de pluripotencia tales como Oct4 o la reactivación del cromosoma X somático inactivo proporcionó evidencia molecular de reprogramación del genoma somático en las células híbridas. Se ha sugerido que la replicación de ADN es esencial para la activación de marcadores de pluripotencia, que se observa por primera vez 2 días después de la fusión (Do y Scholer, *Stem Cells*, 22:941-949 (2004)), y que la expresión en exceso forzada de Nanog en células ES promueve la pluripotencia cuando se fusiona con células madre neurales (Silva et al., *Nature*, 441:997-1001 (2006)).

Reprogramación inducida en cultivo

Se han obtenido células pluripotentes de fuentes embrionarias tales como blastómeros y la masa celular interna (ICM) del blastocisto (células ES), el epiblasto (células EpiSC), células germinativas primordiales (células EG) y células madre espermatozonales postnatales (células "maGSCsm" "tipo ES"). Las siguientes células pluripotentes, junto con su célula/tejido de donante, es como sigue: las células ES partogenéticas derivan de ovocitos murinos (Narasimha et al., *Curr Biol*, 7:881-884 (1997)); se han obtenido células madre embrionarias de blastómeros (Wakayama et al., *Stem Cells*, 25:986-993 (2007)); células de masa celular interna (fuente no aplicable) (Eggan et al., *Nature*, 428:44-49 (2004)); se han obtenido células germinales embrionarias y de carcinoma embrionario de células germinativas primordiales (Matsui et al., *Cell*, 70:841-847 (1992)); se han obtenido GMCS, maSSC y MASC de células madre espermatozonales (Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006); Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119:1001-1012 (2004); y Seandel et al., *Nature*, 449:346-350 (2007)); las células EpiSC se obtienen de epiblastos (Brons et al., *Nature*, 448:191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448:196-199(2007)); se han obtenido células ES partogenéticas de ovocitos humanos (Cibelli et al., *Science*, 295:L819 (2002); Revazova et al., *Cloning Stem Cells*, 9:432-449 (2007)); se han obtenido células ES humanas de blastocistos humanos (Thomson et al., *Science*, 282:1145-1147 (1998)); se han obtenido MAPC de médula ósea (Jiang et al., *Nature*, 418:41-49 (2002); Phinney y Prockop, *Stem Cells*, 25:2896-2902 (2007)); glóbulos de sangre del cordón (obtenidos de sangre del cordón) (van de Ven et al., *Exp Hematol*, 35:1753-1765 (2007)); células derivadas de neuroesferas obtenidas de célula neural (Clarke et al., *Science*, 288:1660-1663 (2000)). Las células de donante de linaje de células germinativas, tal como PGCs o células madre espermatozonales, se conocen por ser unipotentes *in vivo*, pero se ha mostrado que las células pluripotentes tipo ES (Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119:1001-1012 (2004) o maGSCs (Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006)), se pueden aislar después de cultivo prolongado *in vitro*. Mientras que la mayoría de estos tipos pluripotentes de células fueron capaces de diferenciación *in vitro* y formación de teratomas, solo ES, EG, EC, y las células maGSCs o de tipo ES derivadas de células madre espermatozonales, fueron pluripotentes por criterios más rigurosos, ya que fueron capaces de formar quimeras postnatales y contribuir a la línea germinal.

Recientemente, las células madre espermatogoniales adultas multipotentes (MASCs) se obtuvieron de células madre espermatogoniales testiculares de ratones adultos, y estas células tuvieron un perfil de expresión diferente de aquél de las células ES (Seandel et al, Nature, 449:346-350 (2007)), pero similar a células EpiSC, que derivaron del epiblasto de embriones de ratón posterior a la implantación (Brons et al, Nature, 448:191-195 (2007); Tesar et al, Nature, 448:196-199 (2007)).

Reprogramación por factores de transcripción definidos

Takahashi y Yamanaka han informado de la reprogramación de células somáticas de nuevo a un estado tipo ES (Takahashi y Yamanaka, Cell, 126:663-676 (2006)). Reprogramaron satisfactoriamente fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y fibroblastos adultos a células pluripotentes de tipo ES después de la transducción mediada por virus de los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-myc y Klf4, seguido por selección para la activación del gen diana de Oct4 Fbx15 (Figura 2A). Las células que habían activado Fbx15 fueron células iPS (madre pluripotentes inducidas) acuñadas y se mostró que eran pluripotentes por su capacidad para formar teratomas, aunque fueron incapaces de generar quimeras vivas. Este estado pluripotente dependía de la expresión viral continua de los genes Oct4 y Sox2 transducidos, mientras que los genes Oct4 y Nanog endógenos fueron o no expresados o se expresaron a un nivel más bajo que en células ES, y se encontró que sus promotores respectivos estaban ampliamente metilados. Esto está de acuerdo con la conclusión de que las células Fbx15-iPS no se correspondieron con células ES, pero pueden haber representado un estado incompleto de reprogramación. Mientras que los experimentos genéticos habían establecido que Oct4 y Sox2 son esenciales para la pluripotencia (Chambers y Smith, Oncogene, 23:7150-7160 (2004); Ivanona et al., Nature, 442:5330538 (2006); Masui et al., Nat Cell Biol, 9:625-635 (2007)), la función de los dos oncogenes c-myc y Klf4 en la reprogramación es menos clara. Algunos de estos oncogenes pueden ser, en realidad, dispensables para la reprogramación, ya que tanto las células iPS de ratón como humanas han sido obtenidas en ausencia de transducción de c-myc, aunque con baja eficiencia (Nakagawa et al., Nat Biotechnol, 26:191-106 (2008); Weming et al., Nature, 448:318-324 (2008); Yu et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)).

MAPC

Se describen MAPCs humanas en la patente de EE. UU. 7.015.037. Se han identificado MAPCs en otros mamíferos. También se describen MAPCs murinas, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 7.015.037. También se describen MAPCs de rata en la patente de EE. UU. N° 7.838.289.

Estas referencias describen MAPCs aisladas por primera vez por Catherine Verfaillie.

Aislamiento y crecimiento de MAPCs

Se conocen en la técnica métodos de aislamiento de MAPC. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 7.015.037, y estos métodos, junto con la caracterización (fenotipo) de MAPCs. Se pueden aislar MAPCs de múltiples fuentes, que incluyen, pero no se limitan a, médula ósea, placenta, sangre del cordón umbilical y del cordón, músculo, cerebro, hígado, médula espinal, sangre o piel. Es, por tanto, posible obtener aspirados de médula ósea, biopsias de cerebro o hígado, y otros órganos, y aislar las células usando técnicas de selección positivas o negativas disponibles para los expertos en la técnica, basándose en los genes que se expresan (o no se expresan) en estas células (por ejemplo, por ensayos funcionales o morfológicos tales como los desvelados en las aplicaciones anteriormente citadas).

También se han obtenido MAPCs por métodos modificados descritos en Breyer et al., Experimental Hematology, 34:1596-1601 (2006) y Subramanian et al., Cellular Programming and Reprogramming: Methods and Protocols; S. Ding (ed.), Methods in Molecular Biology, 636:55-78 (2010).

MAPCs de médula ósea humana como se describe en la patente de EE. UU. 7.015.037

Las MAPCs no expresan el antígeno leucocitario común CD45 o la glicoforina-A específica de eritroblasto (Gly-A). Se sometió la población mixta de células a una separación en Ficoll Hypaque. Entonces se sometieron las células a selección negativa usando anticuerpos anti-CD45 y anti-Gly-A, agotando la población de células CD45⁺ y Gly-A⁺, y entonces se recuperó el aproximadamente 0,1 % restante de las células mononucleares de la médula ósea. Las células también se podrían sembrar en pocillos recubiertos de fibronectina y se cultivaron como se describe a continuación durante 2-4 semanas para agotar las células de células CD45⁺ y Gly-A⁺. En cultivos de células adherentes de la médula ósea, muchas células adherentes del estroma experimentaron senescencia replicativa alrededor de la duplicación de células 30 y continúa expandiéndose una población de células más homogénea y mantiene telómeros largos.

Alternativamente, se podría usar selección positiva para aislar células mediante una combinación de marcadores específicos de células. Están disponibles para los expertos en la técnica tanto técnicas de selección positiva como negativa, y también están disponibles en la materia numerosos anticuerpos monoclonales y policlonales adecuados para los fines de selección negativa (véase, por ejemplo Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press) y están comercialmente disponibles de varias fuentes.

También se han descrito técnicas para la separación de células de mamífero de una mezcla de poblaciones de células por Schwartz, et al., en la patente de EE. UU. N° 5.759.793 (separación magnética), Basch et al., 1983 (cromatografía de inmunoafinidad), y Wysocki y Sato, 1978 (citometría de flujo activada por fluorescencia).

Se pueden cultivar células en medio de cultivo bajo en suero o sin suero. El medio sin suero usado para cultivar MAPCs se describe en la patente de EE. UU. 7.015.037. Los factores de crecimiento comúnmente usados incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento epidérmico. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 7.169.610; 7.109.032; 7.037.721; 6.617.161; 6.617.159; 6.372.210; 6.224.860; 6.037.174; 5.908.782; 5.766.951; 5.397.706; y 4.657.866; todas enseñan células en crecimiento en medio sin suero.

Métodos de cultivo adicionales

En experimentos adicionales, la densidad a la que se cultivan las MAPCs puede variar desde aproximadamente 100 células/cm² o aproximadamente 150 células/cm² hasta aproximadamente 10.000 células/cm², que incluye aproximadamente 200 células/cm² hasta aproximadamente 1500 células/cm² hasta aproximadamente 2000 células/cm². La densidad puede variar entre especies. Además, se puede variar la densidad óptima dependiendo de las condiciones de cultivo y la fuente de células. Está dentro de la experiencia del experto habitual determinar la densidad óptima para un conjunto dado de condiciones de cultivo y células.

Por tanto, se pueden usar concentraciones de oxígeno atmosférico eficaces inferiores a aproximadamente 10 %, que incluyen aproximadamente 1-5 % y, especialmente, 3-5 %, en cualquier momento durante el aislamiento, crecimiento y diferenciación de MAPCs en cultivo.

Se pueden cultivar las células en diversas concentraciones en suero, por ejemplo, aproximadamente 2-20 %. Se puede usar suero bovino fetal. Se pueden usar mayor suero en combinación con menores tensiones de oxígeno, por ejemplo, aproximadamente 15-20 %. Las células no se necesitan seleccionar antes de la adherencia a placas de cultivo. Por ejemplo, después de un gradiente de Ficoll, se pueden sembrar directamente las células, por ejemplo, 250.000-500.000/cm². Se pueden recoger, posiblemente reunir, y expandir las colonias adherentes.

En una realización, usada en los procedimientos experimentales en los ejemplos, se usaron condiciones de alto suero (alrededor 15-20 %) y bajo oxígeno (alrededor 3-5 %) para el cultivo celular. Específicamente, se sembraron células adherentes de las colonias y se sometieron a pases a densidades de aproximadamente 1700-2300 células/cm² en 18 % suero y 3 % de oxígeno (con PDGF y EGF).

En una realización específica para MAPCs, los suplementos son factores o componentes celulares que permiten que las MAPCs retengan la capacidad de diferenciarse en tipos de células de más de un linaje embrionario, tal como los tres linajes. Esto se puede indicar por la expresión de marcadores específicos del estado no diferenciado, tales como Oct 3/4 (Oct 3A) y/o marcadores de alta capacidad de expansión, tales como telomerasa.

Cultivo celular

Para todos los componentes enumerados a continuación, véase el documento de patente U.S. 7.015.037, que enseña estos componentes.

En general, las células útiles para la invención se pueden mantener y expandir en medio de cultivo que está disponible y es muy conocido en la técnica. También se contempla la suplementación de medio de cultivo celular con sueros de mamífero. También se pueden usar ventajosamente suplementos adicionales para suministrar las células con los oligoelementos necesarios para el crecimiento y la expansión óptimos. También se pueden usar ventajosamente hormonas en cultivo celular. También se pueden usar lípidos y vehículos de lípido para suplementar medios de cultivo celular, dependiendo del tipo de célula y el destino de la célula diferenciada. También se contempla el uso de capas de células alimentadoras.

Las células madre frecuentemente requieren factores adicionales que alienten su unión a un soporte sólido, tal como lamininas, colágenos de tipo I y tipo II, sulfato de condroitina, fibronectina, "superfibronectina" y polímeros de tipo fibronectina, gelatina, poli-D y poli-L-lisina, trombospondina y vitronectina. Se pueden usar otros materiales de recubrimiento adecuados, basados en o compuestos de mezclas de proteínas derivada de la membrana basal. Algunos de estos están comercialmente disponibles, tales como Matrigel. Los recubrimientos pueden usar proteínas de la matriz extracelular, y derivados adecuados de los mismos, así como mezclas de estas proteínas. Una realización de la presente invención utiliza fibronectina. Véanse, por ejemplo, Ohashi et al., Nature Medicine, 13:880-885 (2007); Matsumoto et al., J Bioscience and Bioengineering, 105:350-354 (2008); Kirouac et al., Cell Stem Cell, 3:369-381 (2008); Chua et al., Biomaterials, 26:2537-2547 (2005); Drobinskaya et al., Stem Cells, 26:2245-2256 (2008); Dvir-Ginzberg et al., FASEB J, 22:1440-1449 (2008); Turner et al., J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 82B:156-168 (2007); y Miyazawa et al., Journal of Gastroenterology and Hepatology, 22:1959-1964 (2007)).

Una vez establecidas en cultivo, las células se pueden usar frescas o congeladas y se almacenan como disoluciones madre congeladas, usando, por ejemplo, DMEM con 20 %-40 % de PCS y 10 % de DMSO. En una realización, se usa 20 % de PCS. También están disponibles para los expertos en la técnica otros métodos para preparar disoluciones madre congeladas para células cultivadas.

A efectos de la presente solicitud, los métodos de cultivo adicional, así como los otros métodos de cultivo, también se aplican a los métodos de biorreactor, con respecto a los componentes del medio y las condiciones descritas anteriormente. Como un ejemplo, en una realización ejemplificada, la concentración de oxígeno es 5 %, el suero es aproximadamente 19 % y se añaden tanto EGF como PDGF al medio.

Formulaciones farmacéuticas

El documento de patente U.S. 7.015.037 enseña formulaciones farmacéuticas. En ciertas realizaciones, las poblaciones de célula están presentes dentro de una composición adaptada para y adecuada para la administración, es decir, fisiológicamente compatible.

En algunas realizaciones, la pureza de las células (o medio acondicionado) para administración a un sujeto es aproximadamente 100 % (sustancialmente homogénea). En otras realizaciones es 95 % a 100 %. En algunas realizaciones es 85 % a 95 %. Particularmente, en el caso de mezclas con otras células, el porcentaje puede ser aproximadamente 10 %-15 %, 15 %-20 %, 20 %-25 %, 25 %-30 %, 30 %-35 %, 35 %-40 %, 40 %-45 %, 45 %-50 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, o 90 %-95 %. O se puede expresar aislamiento/pureza en términos de duplicaciones de células donde las células han experimentado, por ejemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 o más duplicaciones de células.

La elección de la formulación para administrar las células para una aplicación dada dependerá de una variedad de factores. Entre estos serán destacados la especie de sujeto, la naturaleza de la afección que está tratándose, su estado y distribución en el sujeto, la naturaleza de otras terapias y agentes que se van a administrar, la vía óptima para la administración, capacidad de supervivencia por la vía, la pauta posológica, y otros factores que serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la elección de vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía de administración exacta y la naturaleza de la forma farmacéutica particular.

Las formulaciones finales de la suspensión acuosa de células/medio normalmente implicarán ajustar la fuerza iónica de la suspensión hasta isotonicidad (es decir, aproximadamente 0,1 a 0,2) y hasta pH fisiológico (es decir, aproximadamente pH 6,8 a 7,5). La formulación final también contendrá normalmente un lubricante fluido.

En algunas realizaciones, las células/medio se formulan en una forma inyectable de dosificación unitaria, tal como una disolución, suspensión, o emulsión. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección de células/medio normalmente son disoluciones y dispersiones acuosas estériles. Los vehículos para las formulaciones inyectables pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos.

El experto puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos opcionales, vehículos, y/o excipiente en composiciones a administrar en los métodos de la invención. Normalmente, está presente cualquier aditivo (además de las células) en una cantidad de 0,001 a 50 % en peso en disolución, tal como en solución salina tamponada con fosfato. El principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5 % en peso, preferentemente aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 % en peso, lo más preferentemente aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,05 % en peso, o aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20 % en peso, preferentemente aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 % en peso, y lo más preferentemente aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5 % en peso.

Ejemplos

Ejemplo 1. Expansión MultiStem de un banco de células por medio de un sistema de expansión de células de biorreactor de fibra hueca

Se usó un sistema de expansión de células, esencialmente como se describe en el documento de patente U.S. 2008/0220523 y Antwiler et al., para expandir una población de entrada de MultiStem, que es una población sustancialmente homogénea. El sistema se designó Quantum CES. Proporcionó un sistema de expansión de mesa que era particularmente útil para la expansión autóloga (pero también es útil para la expansión alógena). Basándose en los resultados mostrados en la presente solicitud, se pueden obtener más de 10^8 células de un único donante.

Se descongeló Multi-Stem después de haber sido almacenado en un banco de células congelado. Para dos experimentos, se inocularon 10×10^6 MultiStem en un biorreactor de flujo continuo con un volumen interno de fluido de 184 ml y un volumen externo de fluido de 303 ml, que contenía $1,1 \times 10^4$ fibras huecas con un área superficial total (intracápsula) de aproximadamente $2,1 \text{ m}^2$ (3255 in^2), un espesor de pared de 50 μm , diámetro interno de

215 μm y longitud total de 295 mm (promedio 30 mm por fibra, intervalo de 10-50 mm). El tamaño de poro tenía un corte aproximado de 16 kDa. Las células se adhirieron al interior de las fibras huecas. Se cultivaron las células durante seis días. Se produjeron 752×10^6 , 753×10^6 y 782×10^6 células en tres experimentos independientes a partir de la misma disolución madre de siembra.

El caudal podría ser variable pero, en general, aumentó a medida que las células proliferaron, de manera que los nutrientes se proporcionaron en cantidades suficientes y los productos residuales se retiraron en cantidades suficientes. En general, el caudal se puede aumentar alrededor de diez veces. Sin embargo, este parámetro se ajustó monitorizando los productos residuales, tales como niveles de lactato y de glucosa, en el medio.

El material de la pared era un material compuesto de PA/PAES/PVP.

Por tanto, en esta realización particular, las fibras se recubrieron con fibronectina.

Para células establecidas, es decir, aquellas que se obtuvieron de un cultivo previamente aislado, expandido, sustancialmente purificado, se usan 5 mg de fibronectina y el recubrimiento se hace durante la noche. Entonces, se lava el recubrimiento y se sustituye por medio. Después de la siembra, las células se unen durante 24 horas sin flujo a través del bucle intracelular. Después de eso, la tasa de alimentación empieza a aproximadamente 0,1 ml por minuto. Basándose en el nivel de lactato y en las tasas de duplicación de las células, la tasa de alimentación se duplica aproximadamente cada 24 horas. En los primeros tres días, los inventores intentaron mantener el nivel de lactato alrededor de 0,5 g/l. Los últimos tres días se mantiene a alrededor 1 g/l con un máximo de 1,5 g/l. En el último día (es decir, cuando las células están expandidas a su máximo), la tasa de alimentación es aproximadamente 3 ml/minuto.

Las células se recogen usando aproximadamente 200 ml de 2,5 % de tripsina con un periodo de incubación de 2,5 minutos y un volumen de recogida de aproximadamente 500 ml.

Cuando se usa un aspirado de médula ósea, la superficie intracápsular se recubre con aproximadamente 10 mg de fibronectina con una fase de unión de 48 horas. La tasa de alimentación se ajusta de manera que si el nivel de lactato va hasta 0,4 a 0,5 g/l, se duplica la tasa de alimentación. La tasa, en general, no es tan alta como en comparación con un cultivo a partir de las células que se han establecido. En un experimento, se usaron aproximadamente 25-30 ml de aspirado de médula ósea para producir aproximadamente 4×10^6 células de BMMC total. Para eso, se sometió médula ósea a un gradiente de Ficoll para retirar células no nucleadas.

Se encuentran detalles en la Figura 5. El esquema de flujo comprende 2 bucles: el bucle intracápsular (IC) y extracápsular (EC). El bucle IC tiene 3 líneas de entrada: línea celular, línea de reactivo y línea de medio IC. Las bolsas se unen a estas líneas para añadir células, agente de recubrimiento, tripsina y medios. Cada línea está controlada por una válvula, que tiene 2 posiciones, abierta y cerrada. La tasa de entrada está controlada por la bomba de entrada IC (1). La circulación dentro del sistema está controlada por la bomba de circulación IC (2). El circuito IC contiene 150 ml. El bucle EC tiene 2 líneas de entrada: Línea de lavado (disolución) y de medio EC. Las bolsas se unen a estas líneas para el lavado con PBS y la adición de medio al bucle EC. La tasa de entrada EC está controlada por la bomba de entrada EC (3) y la circulación dentro de este circuito por la bomba de circulación EC (4). En el bucle EC está presente un oxigenador. Este oxigenador está unido a un cilindro de gas externo (para MultiStem este es 90 % de N_2 ; 5 % de O_2 ; 5 % de CO_2) y mantiene las concentraciones de gas para el medio EC. El medio IC se lleva al equilibrio debido a la perfusión de los gases a través de la membrana en el biorreactor. El circuito EC contiene alrededor de 250 ml. Existen 2 formas de que las disoluciones/células abandonen el sistema: en la bolsa de residuos o la bolsa de recogida. El bucle IC así como el EC tienen una conexión a la bolsa de residuos que está controlada por una válvula. La bolsa de recogida solo tiene una conexión con el bucle IC y también está controlada por una válvula.

Se compararon la población de entrada y la población de salida. Específicamente, se evaluó la población de entrada para la expresión génica de ciertos genes seleccionados y esta se comparó con la población de salida. Además, se compararon la morfología y la ploidía. La población de salida fue sustancialmente idéntica a la población de entrada con respecto a los parámetros medidos.

Ejemplo 2, Producción de MultiStem a partir de médula ósea en un sistema de expansión de células de biorreactor de fibra hueca

Se usó el sistema de expansión celular descrito anteriormente para producir MultiStem a partir de células mononucleares de la médula ósea. Los resultados de la expansión se muestran en la Figura 6. En un régimen posible, a partir de un aspirado de médula ósea, es posible crear un banco de células maestras MultiStem en el plazo de 17 días. Esto necesita una serie de médula ósea a 15 duplicados de población y una serie de expansión para que esta recogida alcance un duplicado de población de 18,5 y un promedio de diez series para crear un banco de células maestras (200 viales de 20 millones de células). Estos 200 viales se pueden usar entonces para crear bancos de células de trabajo. El esquema se muestra en la Figura 7. Sin embargo, el banco de células maestras se podrían aumentar o reducir, tal como hasta 10 veces más células o hasta 10 veces menos células.

Las células de salida, tras la expansión, tuvieron las propiedades inmunomoduladoras asociadas a MultiStem y telomerasa expresada.

REIVINDICACIONES

1. Un método de expansión de células *ex vivo*, comprendiendo el método:

- 5 a) sembrar las células sobre un sustrato de fibra hueca de manera que las células se adhieran al sustrato;
 b) expandir las células adheridas sobre el sustrato; y
 c) retirar las células expandidas del sustrato;

10 en donde las células son células madre no embrionarias no germinativas; expresan telomerasa, no se transforman, tienen un cariotipo normal, y se pueden diferenciar en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

- 15 d) volver a sembrar las células retiradas sobre el mismo sustrato o diferente; y
 e) repetir las etapas b) - d) hasta que se alcance un número deseado de células expandidas.

3. El método de la reivindicación 1, en que el sustrato de fibra hueca está en un biorreactor cerrado de perfusión continua.

20 4. El método de la reivindicación 2, en el que las células se expanden aproximadamente 10-100 veces.

5. El método de cualquier reivindicación previa, en donde la fibra hueca está recubierta.

25 6. El método de la reivindicación 5, en donde el recubrimiento es fibronectina.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el material de pared de fibra hueca es una mezcla de PA/PAES/PVP.

30 8. El método de las reivindicaciones 1-7, en donde las células en la etapa (a) comprenden una población sustancialmente homogénea.

35 9. El método de las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa (a) comprende sembrar células de un tejido, el tejido seleccionado de médula ósea, sangre del cordón umbilical, matriz del cordón umbilical, sangre periférica, placenta, sangre de la placenta, músculo, cerebro, riñón, u otros órganos sólidos.

10. El método de cualquier reivindicación previa, en donde las células madre no embrionarias no germinativas expresan además uno o más de oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.

Figura 1

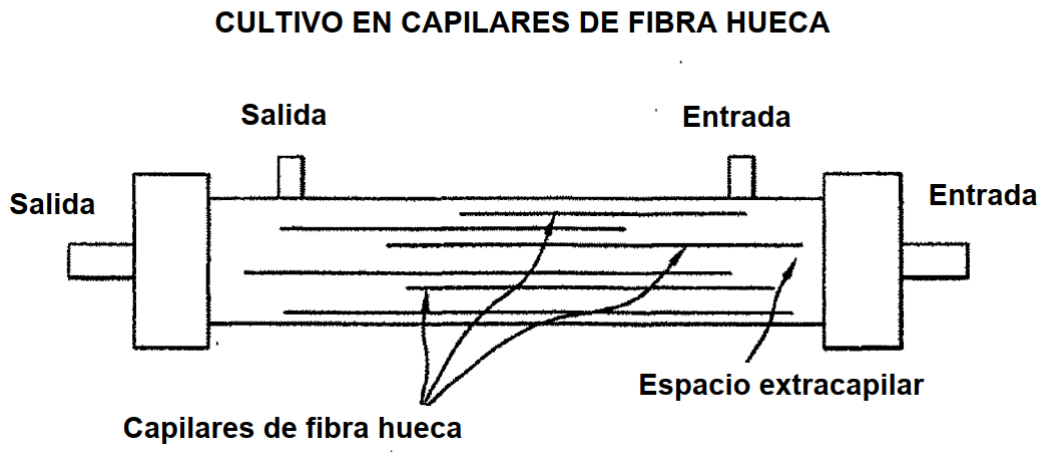


Figura 2

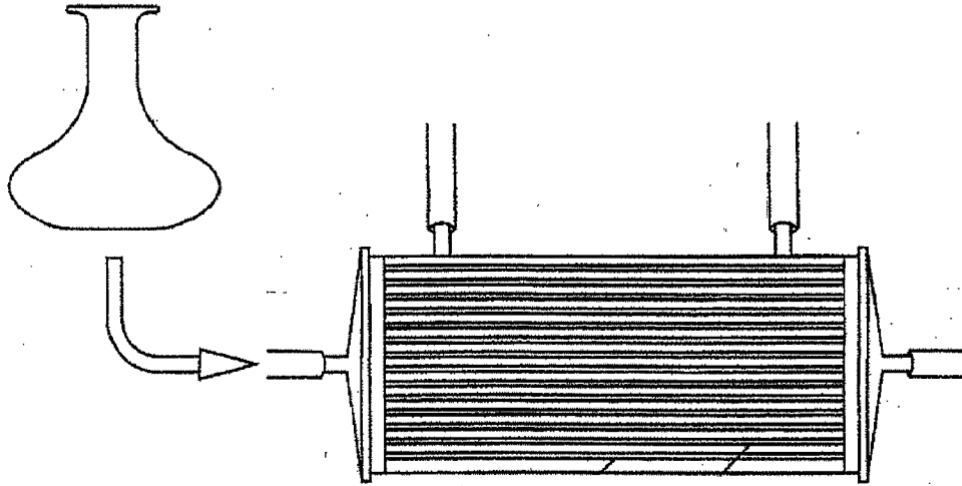


Figura 3A

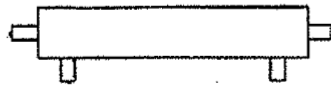


Figura 3B

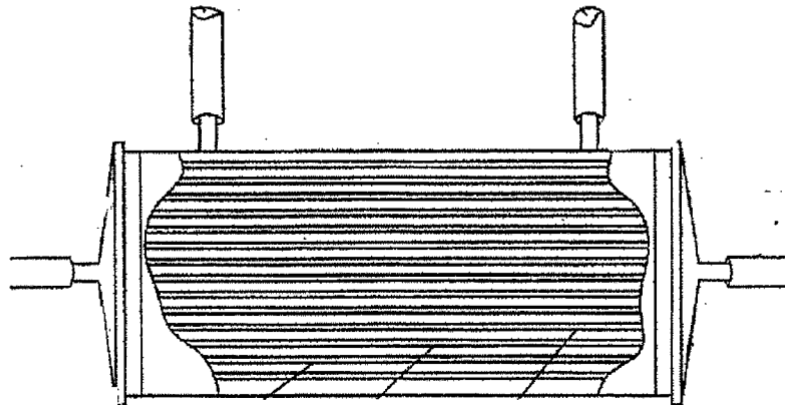


Figura 4

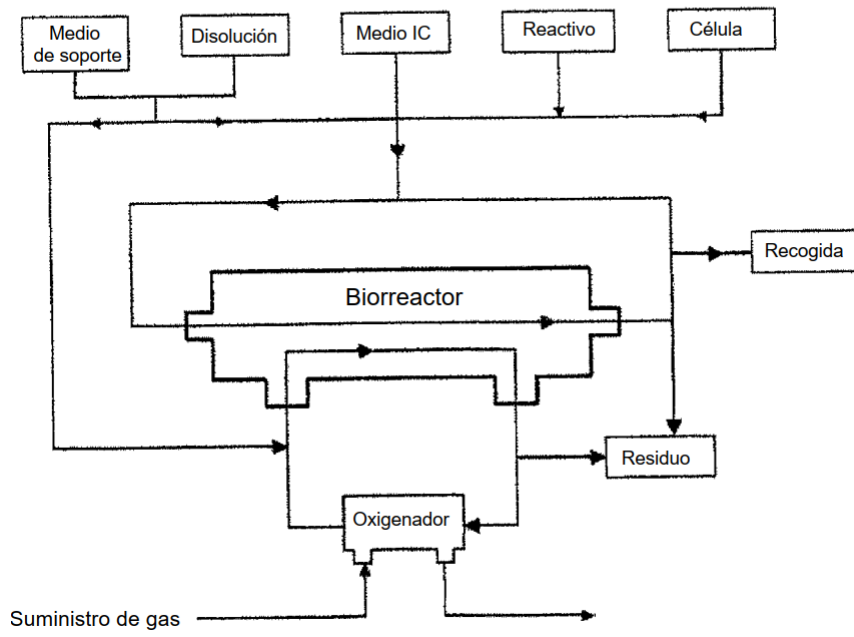


Figura 5

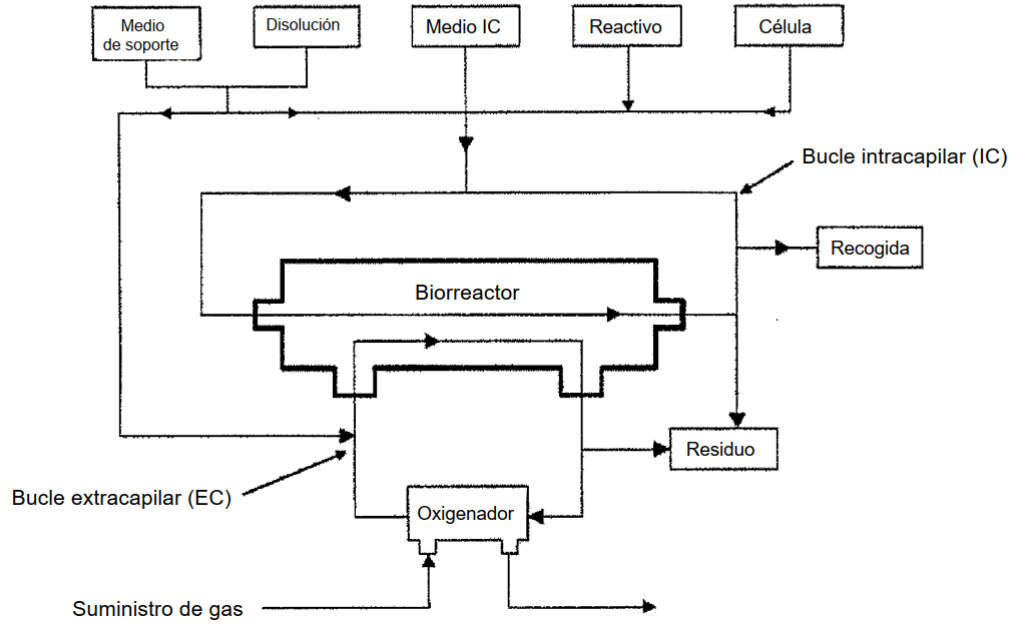


Figura 6

Aislamiento y expansión para 3 donantes diferentes

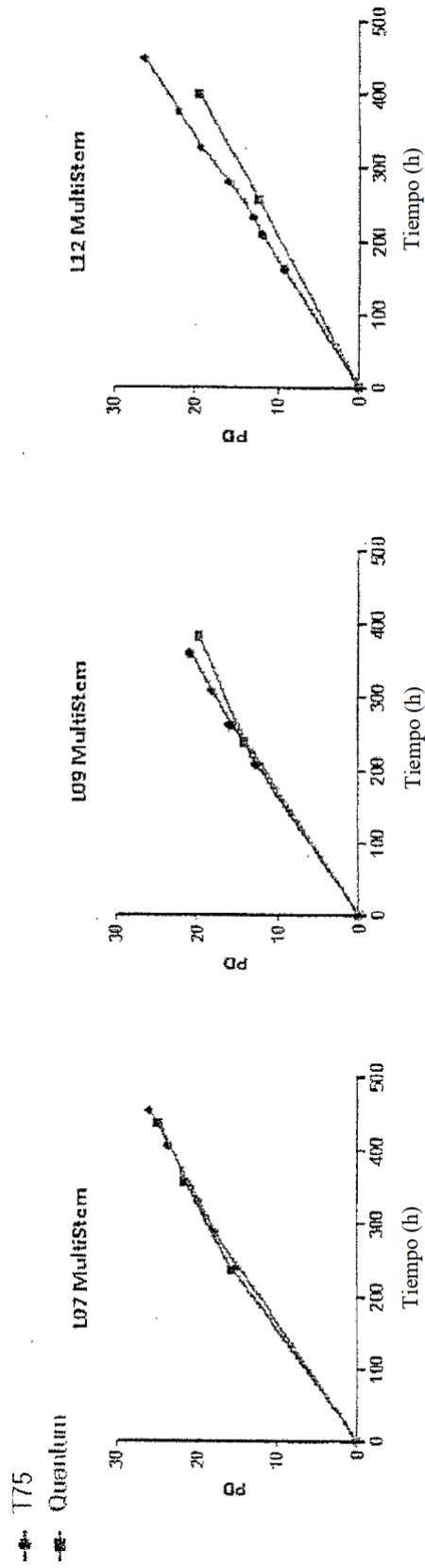


Figura 7

Creación de bancos de células maestras

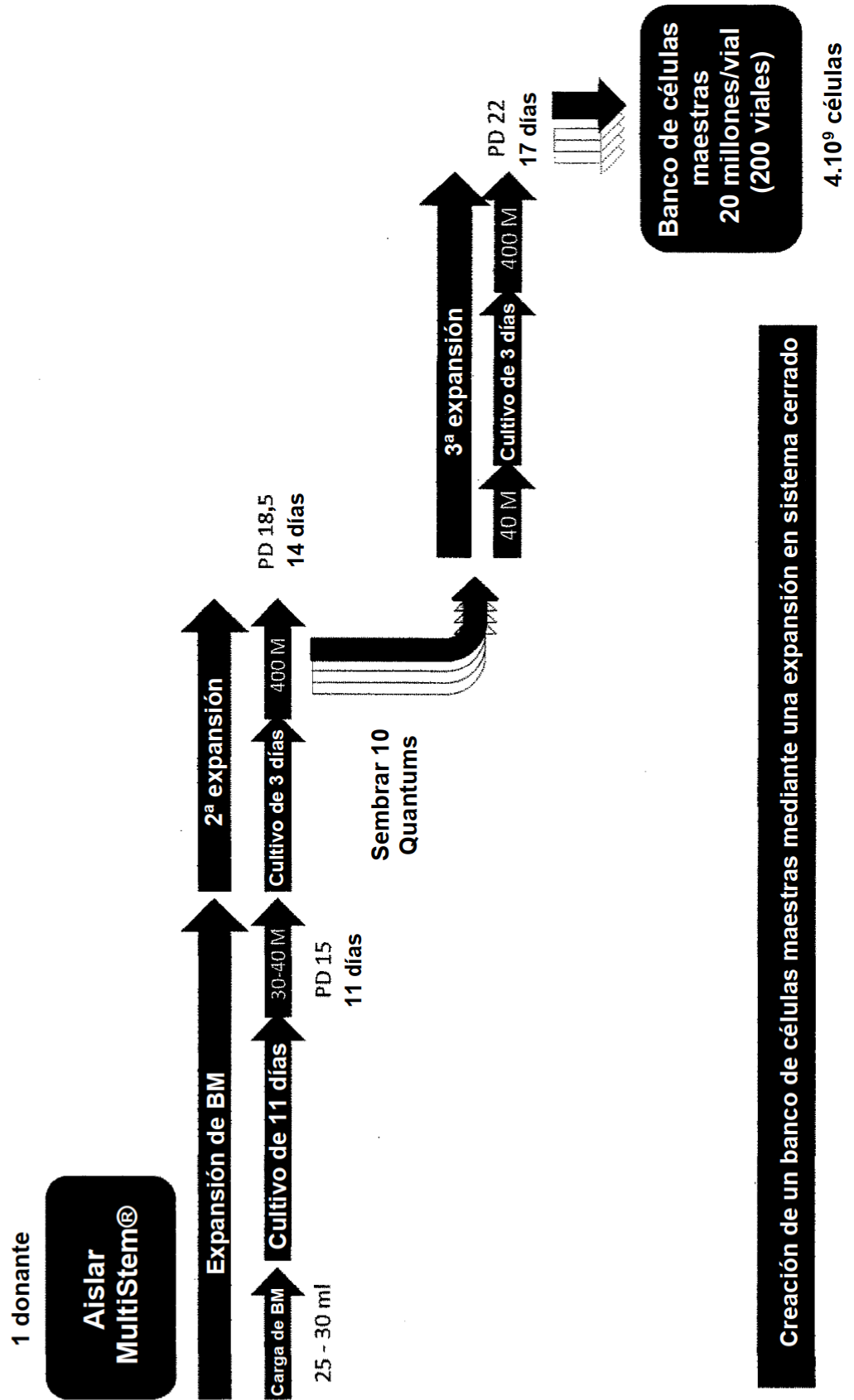


Figura 8

Esquema de flujo

Usado para recubrir,
cargar las células
y añadir
medio nuevo

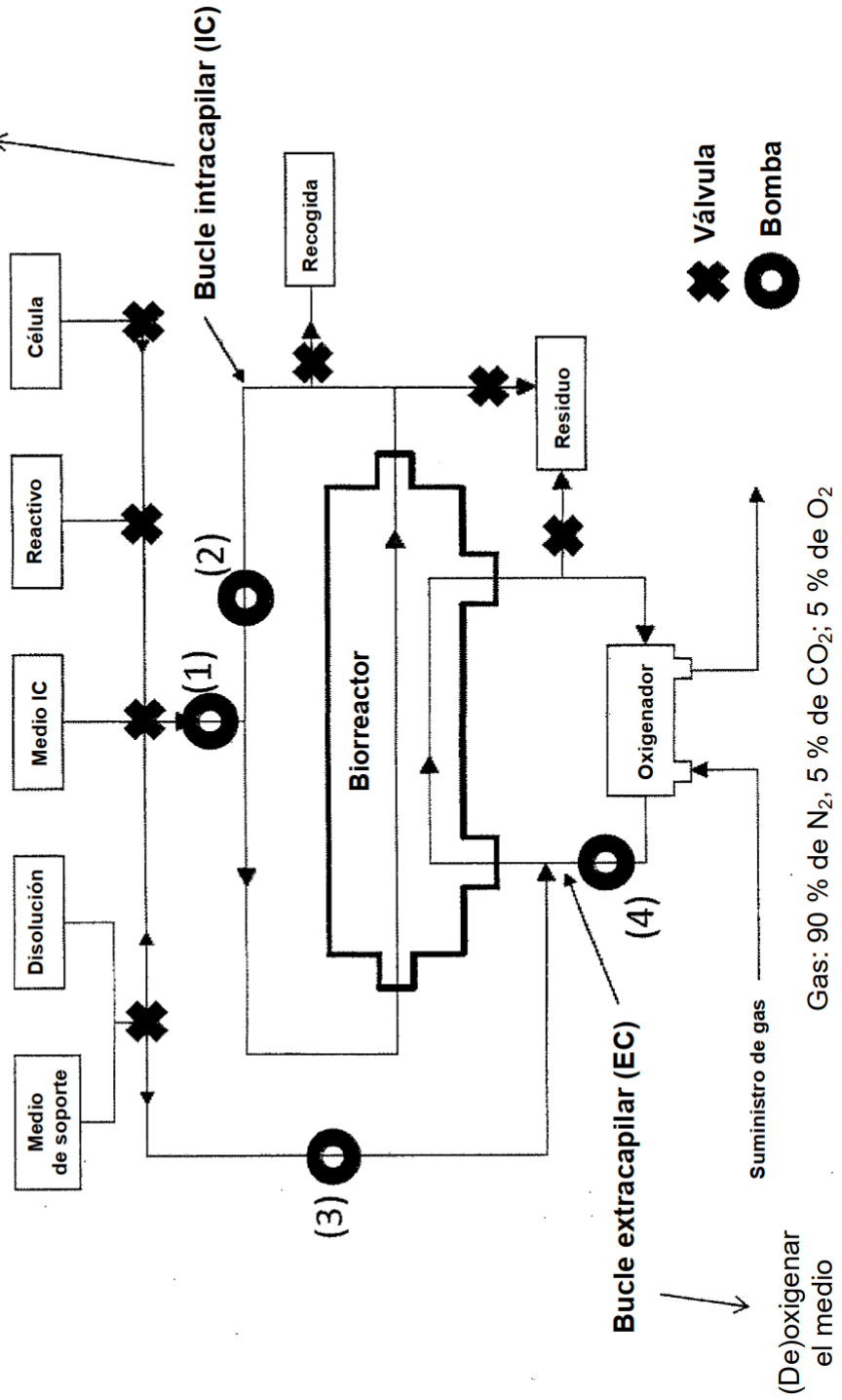


Figura 9

Procedimiento

- El software proporciona procedimientos automatizados
- Configuración
 - Cargar y cebar el conjunto desechable
 - Recubrir la membrana del biorreactor con fibronectina (recubrir durante la noche)
 - Sustituir PBS en ambos bucles por medios
 - Acondicionamiento del medio
 - Cargar las células y dejar que se unan (unión durante la noche)
 - Realizar un lavado para eliminar las células no adherentes
 - Alimentar continuamente las células con medio
 - Ajustar la tasa de alimentación según la generación de lactato y el consumo de glucosa
 - Recoger con tripsina/EDTA
- Carga de trabajo
 - 1 serie dura 6 horas de trabajo
 - Una estimación de 2 a 3 horas si ya estuviera todo disponible en bolsas

Figura 10

Proceso de producción MultiStem®

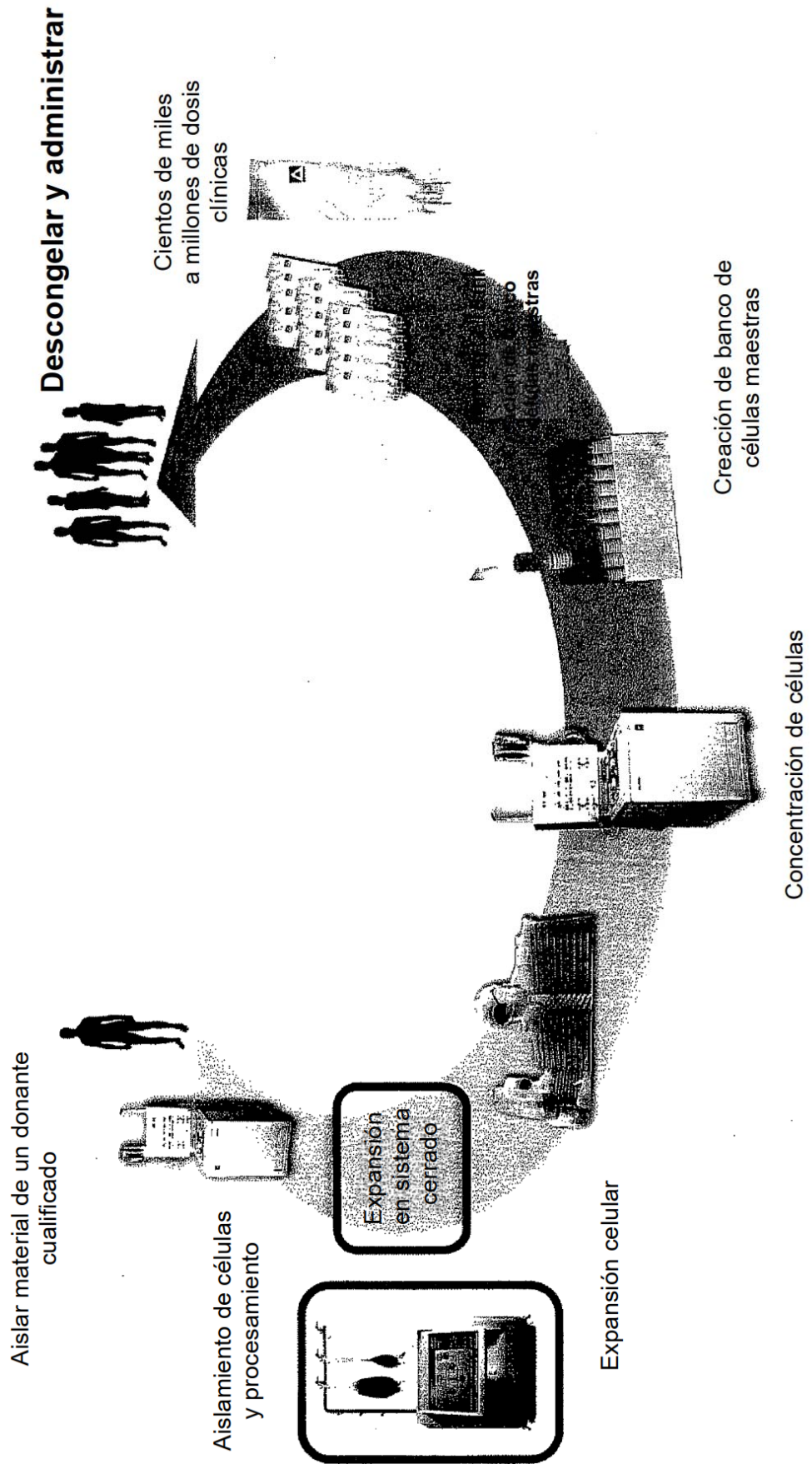


Figura 11

Enfoque de bancos de células

