

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 199**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2014 PCT/BR2014/000301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15024089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2014 E 14771498 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3036321**

54 Título: **Procedimiento para producir células madre multipotentes y progenitores**

30 Prioridad:

**20.08.2013 BR 102013021202**

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

**02.06.2020**

73 Titular/es:

**CCB - CENTRO DE CRIOGENIA BRASIL LTDA.  
(100.0%)**

**Av. Brasil nº 332, Jardim América  
01430-000 São Paulo - SP, BR**

72 Inventor/es:

**AYOUB, CARLOS ALEXANDRE;  
KERKIS, ALEXANDRE y  
LIZIER, NELSON FORESTO**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 764 199 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**

Procedimiento para producir células madre multipotentes y progenitores

5 La presente invención generalmente se refiere a un procedimiento no enzimático para producir células madre multipotentes y progenitores a partir del crecimiento de nichos de células madre.

**Antecedentes de la invención**

10 Se sabe que las poblaciones de células madre están en emplazamientos anatómicos particulares del cuerpo humano, es decir, nichos naturales, que garantizan su mantenimiento y las interacciones celulares necesarias para permitir la división de estas células y la participación en la homeostasis y reparación de tejidos apropiadas. Por tanto, el nicho de células madre es la unidad funcional de cualquier tejido que contiene varios tipos de células que residen en interacción armónica con su matriz extracelular, en un microentorno que proporciona señales intercelulares de corto alcance para el mantenimiento del estado no diferenciado de células.

15 En esta invención, de una manera particular y no exclusiva, los nichos de células madre adecuados comprenden los incluidos normalmente en tejidos extraembrionarios expulsados por el cuerpo de una mujer en el parto, particularmente la placenta, el amnios y el cordón umbilical, incluyendo sus constituyentes (por ejemplo, venas, arterias, epitelio y tejido conjuntivo), preferiblemente después de la extracción de sangre.

20 En el texto que sigue, sólo para facilitar la expresión y como representantes de nichos de células madre naturales (NSCN) adecuados para la invención, se harán referencias específicas al tejido de cordón umbilical intacto (UCT), incluyendo tejido conjuntivo mesenquimatoso (gelatina de Wharton), arterias, vena y epitelio externo, después de la extracción de sangre, dicha mención no limita, de ninguna manera, la invención con respecto al uso de otros NSCN tales como, por ejemplo, tejidos nerviosos, musculares, adiposos, óseos, cutáneos y derivados de órganos (por ejemplo, hepáticos, pulmonares, cardíacos, esplénicos, hepáticos, pancreáticos, testiculares, ováricos o incluso derivados de biopsias), pero sin estar limitados por estos incluidos, así como otros tejidos posnatales y adultos, o incluso tejido de cáncer con NSCN.

25 Se conocen diversos métodos de aislamiento de célula madre a partir de tejidos o sustratos humanos. Sin embargo, hasta ahora, ningún método puede garantizar la obtención de células a gran escala en respuesta a la demanda creciente de células madre y sus derivados para terapias, y para producción a gran escala de moléculas bioactivas (péptidos, factores de crecimiento, hormonas, etc.) que tienen propiedades tróficas de pericitos y que pueden reemplazar a la SC (célula madre, por sus siglas en inglés) en muchas terapias.

30 Existen incontables menciones en el estado de la técnica a procedimientos en los que diversos sustratos en el cuerpo humano se someten a procedimientos enzimáticos para obtener y/o recuperar células madre. Sin embargo, incluso con el uso de procedimientos enzimáticos, no existe ninguna divulgación de métodos que produzcan células madre en grandes cantidades.

35 Se sabe que se requieren cantidades sustanciales de células madre, entre otros, para la producción de tejidos, trasplantes de órganos, impresión de tejidos y/u órganos completos, cicatrización de una herida directamente en el paciente e inmunosupresión en muchas enfermedades autoinmunitarias. Existen referencias en la bibliografía de que estos tratamientos requieren una cantidad de  $2 \times 10^6$  células por kilogramo de peso del paciente, estando estas células madre estandarizadas en relación con las propiedades de ST y el número de pasos de células.

40 Tal como se verá a continuación, la presente invención proporciona un procedimiento simple con alto rendimiento para obtener grandes cantidades de células madre y progenitores, de una manera esencialmente no enzimática.

**Descripción de la figura**

45 Figura 1 - Poblaciones celulares obtenidas mediante el procedimiento de la invención y mediante 2 métodos enzimáticos alternativos, después de 72 horas en cultivo en A, B, C y después de 5 días en A1, B1 y C1.

**Descripción de la invención**

50 La presente invención se refiere a un procedimiento innovador para producir células madre adultas, particularmente células madre mesenquimatosas/estromales multipotentes y precursores perivasculares, tales como pericitos.

60 A diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, el procedimiento de la invención es esencialmente no enzimático y se basa en la propagación y aislamiento de la población de células madre que prolifera de manera activa en sus nichos, de una manera biológicamente sinérgica (es decir, en equilibrio con su entorno). La manera de verificar si un tejido particular es un nicho de células madre no forma parte de la invención, que se conoce por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

La presente invención proporciona un procedimiento ventajoso y robusto para producir células con el 100% de éxito y eficacia con respecto a los tejidos procesados, lo que permite la obtención de grandes cantidades de células y retrasos de tiempo mínimos relacionados con el procedimiento de aislamiento.

5 Las células madre mesenquimatosas (MSC) aisladas en grandes cantidades a partir del procedimiento de la invención presentan todas las características de las células madre mesenquimatosas y de tipo pericito, o bien para la producción de moléculas medicinales usadas directamente en terapia o bien en la industria farmacéutica para la producción de fármacos. La SC obtenida mediante el procedimiento de la invención presenta una gran capacidad de diferenciación (inducida o espontánea) *in vitro* e *in vivo*; con gran capacidad de regeneración de tejidos usando  
10 medios de cultivo y agentes y/o sustratos (“andamio”) en una fase de soporte líquida, rígida o gelatinosa, o una matriz extracelular (complejo de macromoléculas: componentes fibrosos, proteínas y polisacáridos) de diversa naturaleza, naturales o sintetizados.

15 Una característica de las células madre/ los progenitores producidos mediante el procedimiento de la invención es que tienen el mismo patrón de expresión de marcadores relacionados con el estado no diferenciado de células *in vivo* presentes dentro de fragmentos cultivados.

El procedimiento de la invención comprende, de una manera innovadora, el cultivo *in vitro* de nichos de SC (NSCN). Sin ser una justificación de la invención, se sabe que el cultivo *in vitro* de células madre fuera de su nicho habitual puede inducir cambios en la estabilidad de cariotipos o fenotipos, en la firma molecular y la estabilidad genómica. Adicionalmente, debido a la división desigual de células madre (que produce una célula madre y un progenitor), pierden su multipotencialidad con pasos de células (capacidad para producir un espectro amplio de tipos celulares diferenciados). Esta población mixta de células madre mesenquimatosas derivada del nicho natural puede proporcionar mayor sinergia biológica de las células aisladas según el procedimiento de la invención, que dispensa  
20 la retirada previa de vasos sanguíneos o cualquier otro tejido, extrayendo sólo la sangre presente.

25 Una característica del procedimiento de la invención es el cultivo flotante (o 3D) de fragmentos de tejido de NSCN, que promueve cantidades sustanciales de células madre y progenitores sustancialmente libres de cambios genéticos y biológicos.

30 Según la invención, los fragmentos de tejido se mantienen flotando en el medio de cultivo basal, produciendo células madre/células madre progenitoras. La liberación de SC se produce a través de la migración natural de células desde los fragmentos de NSCN hasta el plástico del frasco de cultivo, lo que asegura que estas células mantendrán la homogeneidad del perfil molecular de la población y la supervivencia sin cambios después de este aislamiento natural.  
35

Se observa que el cultivo de fragmentos flotantes de tejido, según la invención, presenta normalmente la siguiente dinámica en la producción de SC: con el cultivo de fragmentos de NSCN en suspensión, se produce la difusión eficiente de gases y nutrientes a lo largo de todo el fragmento, las SC abandonan el estado de quiescencia y tienen su proliferación en los nichos estimulados (es decir, tienen su número aumentado mediante división simétrica), y su migración también se produce desde dentro de los fragmentos de NSCN hacia la superficie de los mismos en respuesta a la fragmentación de tejidos. Por tanto, los fragmentos se vuelven más densos y de manera temporal tocan/se adhieren al sustrato del frasco de cultivo, liberando SC para migrar fuera del residuo y adherirse al sustrato. Después de la adhesión del residuo al sustrato, se produce un aumento de migración en detrimento de la proliferación, ya que la difusión de nutrientes/gases se vuelve aparentemente menos intensa. Luego el fragmento tiende a volverse más ligero debido a la extensa migración de SC hacia el sustrato y, de manera autónoma o mediante simple agitación del frasco de cultivo, el fragmento se desprende del sustrato y flota. Una vez que flota de nuevo, se restablece la difusión de gases y nutrientes a lo largo de todo el tejido y se produce un nuevo aumento en la proliferación de SC en los nichos, y el fragmento se vuelve de nuevo más denso, estableciendo un nuevo ciclo de adhesión y liberación de SC y la posterior flotación. Este sistema de flotación-proliferación-sedimentación-adhesión-migración-liberación puede repetirse muchas veces durante el cultivo de fragmentos de tejido a partir nichos de SC naturales, produciendo colonias de células madre. Según pasa el tiempo, pueden observarse múltiples colonias que consisten en células de la invención en el fondo del frasco de cultivo.  
40  
45  
50

55 Según una realización preferida, el cultivo celular en el fondo del frasco de cultivo, un cultivo relativamente homogéneo de células madre con características de células madre/progenitores, se mantiene semiconfluyente, particularmente con del 70% al 90% de confluencia, para impedir la diferenciación celular espontánea. El término “semiconfluyente” significa un cultivo que no es tan denso de manera que podría permitir un contacto sustancial de las células entre sí, tal como se verifica en cultivos confluentes de alta densidad.  
60

Una realización particular de la invención incluye de manera adicional modificaciones del medio de cultivo basal, mediante la adición de factores de crecimiento y/u otras moléculas bioactivas que pueden alterar las características de células surgen del procedimiento.

65 En una realización particular de la invención, el tejido de NSCN que va a cultivarse puede someterse a un tratamiento previo suave inicial con enzimas de disociación (por ejemplo, tripsina, colagenasa, TrypLE™, etc.) antes

de la inmersión de estos tejidos en medio de cultivo. Tal tratamiento previo no tiene como objetivo una digestión extensa del tejido, sino sólo una pequeña relajación de la coherencia de tejido para facilitar el movimiento de las SC cuando se sumergen en el medio de cultivo basal.

- 5 Después del final del procedimiento de la invención, el tratamiento enzimático adicional de SC adheridas y sus respectivos pasos de células a otros recipientes para el crecimiento o expansión *in vitro* o *ex vivo* de las células madre/progenitores resultantes favorece el aislamiento de pericitos.

10 Una peculiaridad del procedimiento de la invención es la retirada y transferencia de fragmentos de NSCN, por ejemplo, mediante cualquier manera mecánica adecuada, por ejemplo, con la ayuda de dispositivos tales como una pipeta, pinza, aguja o instrumentos, o vertiendo simplemente el contenido de un recipiente al otro. Después de transferir estos trozos de tejido de NSCN, (fragmentos flotantes) a un nuevo recipiente, pueden continuar la producción de SC con cero pasos (sin pasos), ya que no se realizó ningún tratamiento enzimático.

- 15 El procedimiento de la invención usa fragmentos de NSCN, que comprenden células madre que proliferan dentro del tejido y siguen expresando marcadores de diversos tipos de células madre incluso después de las varias transferencias de tejido mecánicas mencionadas.

20 El procedimiento de la invención es mínimamente invasivo en el uso de nichos comprendidos en tejidos extraembrionarios expulsados por el cuerpo de una mujer en el parto, particularmente el cordón umbilical, el amnios y la placenta. Entre otras ventajas de las células madre contenidas, debe mencionarse su juventud. El envejecimiento de los mamíferos se asocia con una reducción en la regeneración de tejidos, aumento de aparición de enfermedades degenerativas y cáncer. Debido a que las células madre regeneran muchos tejidos adultos y cuando estos, por acumulación de mutaciones, pueden contribuir al desarrollo de cáncer, las modificaciones asociadas con la edad en células madre contribuyen probablemente a la morbilidad asociada con la edad. Sin perjuicio de esto, el papel de las células madre en diversos tejidos disminuye con la edad, lo que resulta posiblemente en la pérdida de expresión de los supresores tumorales, daño del ADN, cambios en la fisiología celular y cambios en el entorno del tejido. No se sabe si la disminución de la función de células madre durante el envejecimiento influye en la longevidad del organismo; sin embargo, los mecanismos que influyen en la longevidad también modulan la morbilidad asociada con la edad, en parte, a través de efectos sobre las células madre. Por tanto, las células madre de tejidos extraembrionarios relacionados con el parto tienen una importancia extrema para la terapia celular, ya que son células jóvenes, destacando el hecho de que las células obtenidas mediante el procedimiento de la invención no son células embrionarias.

- 35 Aunque no es esencial, un lavado inicial del tejido de NSCN es apropiado para el procedimiento de la invención, particularmente para la extracción de sangre antes de la fragmentación del tejido que se hará crecer.

40 Particularmente, se realiza lavado de NSCN de manera externa y de manera interna. Se realiza de manera externa, por ejemplo, con agua destilada o solución salina tamponada estéril (PBS o disolución fisiológica y antibióticos (tales como penicilina y estreptomycin al 2%)). Se realiza de manera interna, por ejemplo, lavando el interior de los vasos sanguíneos (arterias y venas) con solución salina tamponada estéril o destilada (PBS o disolución fisiológica y antibióticos (tales como penicilina y estreptomycin al 2%)).

45 La fragmentación de NSCN que va a cultivarse según el procedimiento de la invención puede realizarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, con cuchillas afiladas, mediante corte manual o mecanizado, en condiciones estériles. Preferiblemente, pero no esencialmente, el corte puede realizarse con una pequeña presión sobre el tejido, sin calentar, de manera adecuada con un cortador de chorro de agua bajo presión.

50 En una realización particular, la presente invención también se refiere a crioconservación/descongelación repetitiva de fragmentos de tejido del/de los NSCN, permitiendo, por tanto, la producción continuada de nuevas células madre/progenitores a gran escala, particularmente cuando involucra tejido de NSCN de un único paciente y en bajo pasos de células (normalmente menos de o igual a 5). Sin embargo, este aspecto no limita el procedimiento de la invención, que puede usar NSCN de un único paciente, o de dos o más pacientes distintos, o puede usar de manera concomitante NSCN diferentes de uno o más pacientes, o con más pasos de NSCN.

55 Las células obtenidas según el procedimiento de la presente invención expresan, en el estado no diferenciado, un grupo de marcadores de MSC (CD29, CD73, CD90, CD105) simultáneamente con marcadores de pericitos (CD140b y CD166) y no expresan marcadores de linaje hematopoyético (CD34 y CD45) ni marcadores de histocompatibilidad (HLA-DR). Las células obtenidas del procedimiento de la invención son multipotentes, capaces de la autorrenovación con proliferación continua y diferenciación *in vitro*, con el uso de condiciones conocidas, por ejemplo, adición de agentes de inducción (por ejemplo, ácido retinoico, sulfóxido de dimetilo, etc.), factores de crecimiento y citocinas. En estas condiciones, las células madre/progenitores de la invención se diferencian dando distintos tipos de célula, tales como hueso, cartílago y grasa. Debido a que las células madre/los progenitores obtenidos según la invención también expresan el marcador CD31, que es característico de células progenitoras endoteliales, pueden diferenciarse de manera adicional en células musculares, endoteliales y nerviosas.

65

Las células y/o fragmentos obtenidos mediante el procedimiento de la invención son adecuados en muchas posibilidades de uso, tal como en usos terapéuticos, no terapéuticos, biotecnológicos y farmacéuticos.

5 Por tanto, la presente invención tiene como objetivo un procedimiento para obtener células madre, particularmente células madre multipotentes/progenitores del cultivo de tejido de NSCN, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

A - obtención de uno o más NSCN;

10 B - preparación previa de uno o más NSCN;

C - preparación de fragmentos de tejido de uno o más NSCN;

15 D - promoción de la propagación de SC cultivando fragmentos de NSCN en un medio de cultivo basal;

E - separación de la SC de los fragmentos de NSCN;

F - opcionalmente, los fragmentos de NSCN separados en E se devuelven a la etapa D.

20 La mención de SC en las etapas del procedimiento incluye células madre y progenitores.

25 La etapa A del procedimiento de la invención se realiza particularmente con la obtención de un NSCN particular, tal como cordón umbilical. Por consiguiente, sin excluir a ningún otro, el/los NSCN usado(s) en el procedimiento de la invención son tejidos del parto de una mujer, particularmente el cordón umbilical, el amnios y la placenta, incluso más particularmente el cordón umbilical intacto, con arterias y vena, gelatina de Wharton y epitelio. Los tejidos nerviosos, musculares, adiposos, óseos, cutáneos y derivados de órganos, tales como de tejidos hepáticos, pulmonares, cardíacos, esplénicos, hepáticos, pancreáticos, testiculares, ováricos o incluso derivados de biopsias, son adecuados para la invención, pero no se limitan a estos incluidos, así como otros tejidos posnatales y adultos, e incluso tejido canceroso que tienen NSCN.

30 Según el punto (B) anterior, el NSCN se somete a una preparación previa, que puede consistir en limpieza, lavado, cortes previos de tejidos, molienda, compresión, tratamiento previo suave con enzimas de disociación (colagenasa, dispasa, tripsina, TrypLE™, entre otras), etc.

35 Particularmente, el tejido de NSCN se somete a limpieza/lavado, que tiene como objetivo la extracción de sangre y otros sustratos que pueden afectar de manera adversa a la propagación de SC durante el cultivo, por ejemplo, mediante la inducción de diferenciación, intoxicación, contaminación, etc. En el caso particular del cordón umbilical, se lleva a cabo una limpieza apropiada tanto de manera interna como de manera externa, por ejemplo, con uno o más de agua destilada, solución salina, disolución fisiológica y antibióticos (por ejemplo, penicilina y estreptomycinina).  
40 El lavado interno se lleva a cabo, por ejemplo, inyectando el sustrato en los vasos del tejido internos, y, por tanto, retirando el material arrastrado.

45 En una realización particular, el lavado y la limpieza del cordón umbilical se lleva a cabo, por ejemplo, en partes precortadas de 5 a 10 cm de la vena del cordón umbilical, evitando la inclusión de coágulos sanguíneos.

50 Todavía según la etapa B, la preparación previa puede implicar un tratamiento previo inicial suave del tejido con enzimas de disociación (por ejemplo, tripsina, colagenasa, TrypLE™, etc.). Tal tratamiento previo no tiene como objetivo la digestión extensa del tejido, sino sólo una pequeña relajación de la coherencia de tejido para facilitar el movimiento de SC cuando se sumergen en el medio de cultivo basal.

55 En relación con la etapa C del procedimiento de la invención, una manera de fragmentar el tejido de NSCN, tal como ya se ha mencionado, es de cualquier manera adecuada para este propósito. En el caso del cordón umbilical, son adecuados los fragmentos obtenidos a partir de cortes transversales y/o longitudinales hasta alcanzar, por ejemplo, cubos con dimensiones de desde 0,5 hasta 1 cm. Cualquier otro tamaño o formato de fragmento se incluye en el alcance de la invención, incluso partículas obtenidas mediante molienda del tejido.

60 Todavía en relación con la etapa C, en una realización particular de la invención, la fragmentación de NSCN tiene como objetivo el uso sólo de partes específicas de tejidos intactos para el crecimiento en la siguiente etapa D. Por ejemplo, en el caso del cordón umbilical, pueden usarse exclusivamente fragmentos de la vena, las arterias, el epitelio o la gelatina de Wharton, generando cada uno células madre/progenitores particulares. Son fragmentos de constituyentes de NSCN (vena, arteria, epitelio, etc.) que pueden usarse por separado, según el fin deseado, para producir células con firma molecular, potencial de diferenciación y producción de moléculas activas específicas, o pueden usarse juntos.

65 En relación con la etapa D del procedimiento de la invención, el medio basal para cultivar fragmentos de cordón umbilical y/o células de NSCN es cualquiera que permita la propagación/expansión y el aislamiento de células madre

y progenitores con las mismas características fenotípicas y moleculares. Por ejemplo, un medio adecuado es DMEM/F12 ("medio de Eagle modificado con Dulbecco"/F12 de Ham, 1:1, de Invitrogen, EE.UU.) o cualquier sustrato equivalente conocido por un experto en la técnica, que contiene normalmente aminoácidos, proteínas, suero y antibióticos.

5 Dicho medio de cultivo basal comprende de manera adecuada, por ejemplo,  $\pm 15\%$  en peso de suero. Particularmente, dicho suero es derivado de bovino tal como, por ejemplo, suero bovino fetal y también son adecuados los sueros humanos (por ejemplo, plasma rico o pobre en plaquetas) y otros animales, incluyendo mezclas de los mismos, así como otros reactivos naturales o sintéticos que pueden permitir el aislamiento de SC.

10 El medio de cultivo de la etapa D contiene de manera adecuada antibiótico y/o aminoácidos. Los antibióticos usados están comprendidos en el conocimiento técnico del técnico experto, por ejemplo, una combinación de penicilina y estreptomycinina o gentamicina. Los aminoácidos útiles para llevar a cabo la invención son glutamina, aminoácidos no esenciales o mezclas de los mismos, entre otros.

15 El intercambio/renovación frecuente de medio de cultivo se lleva a cabo particularmente en la etapa D, ya que los fragmentos de tejidos de NSCN gastan medio más rápidamente que las células. El intercambio de medio como el cambio de pH de básico a ácido es apropiado, evaluándose dicho cambio, por ejemplo, por cambio del color del medio de crecimiento, normalmente de rosa a amarillo, o de cualquier otra manera apropiada.

20 Opcionalmente, después de la etapa D del procedimiento de la invención, puede prepararse un concentrado que contiene fragmentos de NSCN y células madre obtenidos (por ejemplo, retirando parte o todo el medio de cultivo basal), conservándose tal concentrado para su uso en un momento futuro. La conservación de tal concentrado es, por ejemplo, a través de criopreservación; en maneras conocidas por un experto en la técnica. El uso de este concentrado, en un momento futuro se realiza de manera apropiada con descongelación, nueva inserción en el medio de cultivo basal y la posterior separación de células/progenitores de los fragmentos, según el punto E anterior.

25 En una realización particular, el concentrado de NSCN y/o células madre obtenido y/o acondicionado mediante el cultivo también puede liofilizarse, con usos adicionales tras su reutilización en el procedimiento de la invención (etapa D).

30 Según la etapa E del procedimiento de la invención, después de un ciclo de cultivo, los fragmentos de tejido de NSCN se aíslan de manera mecánica y pueden someterse, según la etapa F, a la etapa de cultivo (D), o bien inmediatamente posterior o bien después del almacenamiento (criopreservación). La reutilización de fragmentos en nuevos cultivos puede realizarse hasta el agotamiento de la capacidad para liberar SC/progenitores. Tales fragmentos de la etapa E pueden mezclarse con nuevos fragmentos, originados después de las etapas A, B y C, que no se han usado previamente, para el cultivo en la etapa D.

35 En una realización particular, los fragmentos de NSCN también pueden descelularizarse, digerirse y/o liofilizarse después de la etapa E, que tiene como objetivo usos adicionales además de la reutilización, según la etapa F del procedimiento de la invención.

40 El tratamiento que puede administrarse para adherir SC/progenitores después de la separación de fragmentos, según el punto E anterior, lo conoce en sí mismo un experto en la técnica. Las células se lavan normalmente, por ejemplo, con solución salina tamponada estéril, con o sin antibióticos, para luego llevar a cabo su disociación (ya que las células son semiconfluentes), ya sea por medios mecánicos o enzimáticos, para realizar su recogida. Preferiblemente, esta disociación se realiza por medios mecánicos, particularmente usando Tryple™ (comercializado por Invitrogen, una empresa estadounidense), que es una enzima excepcionalmente pura libre de componentes animales y suave con las células. Puede usarse también una disolución de aproximadamente el 0,25-0,05% de tripsina/ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), que comercializa, por ejemplo, Sigma-Aldrich. Después de eso, las células recogidas se someten normalmente a paso de células por medios enzimáticos, o se criopreservan para su uso posterior, según los procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

45 En una realización particular, las SC/los progenitores obtenidos mediante el procedimiento de la invención, aislados según la etapa E del procedimiento de la invención, también pueden someterse a liofilización para usos específicos. El medio de cultivo acondicionado por células y/o fragmentos también puede liofilizarse para producir sustratos de cultivos, moléculas bioactivas, complementos alimenticios y para uso estético.

50 La criopreservación de fragmentos de tejido de NSCN o SC/progenitores, o mezclas de los mismos, posible después de la etapa E del procedimiento de la invención, se realiza de manera adecuada en un congelador, a temperaturas alrededor de  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente en nitrógeno líquido, a temperaturas alrededor de  $-196^{\circ}\text{C}$ , según el conocimiento de un experto en la técnica.

55 Después del punto E del procedimiento de la invención, las SC/los progenitores aislados se someten normalmente a paso de células enzimático, según el procedimiento conocido por un experto en la técnica, en un número adecuado para el fin previsto. Se notifica la gran estabilidad de los marcadores de SC de la presente invención después de un

gran número de pasos, por ejemplo, 25 o más.

El cultivo de fragmentos de NSCN de tejido y la multiplicación por paso de células de SC/progenitores resultantes del procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo sobre microportadores o en biorreactores conocidos previstos para producir células a gran escala, tal como se conoce en el campo técnico.

### Ejemplos

Las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención se proporcionan a continuación para ilustrar su realización, sin conferir ninguna limitación más allá de las expresadas en las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplo 1

##### Procesamiento de cordón umbilical y cultivo celular

La descripción de este ejemplo representa el número medio de incontables realizaciones realizadas de la misma manera.

A partir de un cordón umbilical intacto, se preparó un fragmento de 5 cm, que se lavó dos veces por dentro y por fuera (en este caso con una aguja o una jeringa) con solución salina tamponada estéril [PBS 0,01 M, pH 7,4] que contenía antibióticos [100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina] para eliminar, en la máxima extensión posible, la contaminación con sangre. En los primeros lavados internos, la disolución de lavado todavía estaba contaminada con sangre y tenía un color rojizo. Adicionalmente, se usó agua estéril inyectada en los vasos del cordón umbilical, y la disolución de lavado quedó incolora. Entonces, usando un bisturí, se cortó el cordón de manera longitudinal y transversal para obtener aproximadamente 35 trozos de 0,5 x 0,5 cm aproximadamente, y luego se transfirieron a un matraz de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY) que contenía medio DMEM/F12 (medio de Eagle modificado con Dulbecco /F12 de Ham, 1:1, comercializado por Invitrogen, una empresa estadounidense) complementado con suero bovino fetal al 15% (FBS, comercializado por Hyclone, una empresa estadounidense), 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM y 2 mM de aminoácidos no esenciales. Se mantuvo el frasco en un invernadero de CO<sub>2</sub> bajo atmósfera húmeda y a 37°C. Los fragmentos empezaron a liberar las células desde los días 2-3 ó 5-7, se observó una variación individual en otras realizaciones del procedimiento de la invención. Se mantuvo el crecimiento del cultivo celular de fragmentos de cordón umbilical en estas condiciones durante dos semanas. El color del medio permaneció rosa (alcalino) y no amarillo (ácido) por sustitución diaria, y se verificó que el tejido consume el medio muy deprisa. Los fragmentos quedaron flotando o sobrenadando en el medio de cultivo. Una vez que el fondo del frasco se cubrió con células, formando colonias semiconfluentes individuales, en 5-7 ó 9-11 días, según la variación observada con diferentes fragmentos, se transfirieron los fragmentos, vertiendo simplemente a otro frasco del mismo tamaño.

Las células adheridas a los frascos tenían una morfología similar a los fibroblastos, alta tasa de proliferación y se generaron casi  $4 \times 10^6$  células a partir de los 35 fragmentos en 2 semanas, las células del cordón umbilical presentaron alta capacidad de formación de colonias individuales y, en el paso 1, la frecuencia de formación de colonias celulares era de alrededor de 100 colonias/100 células sembradas en placa en una placa de 90 cm<sup>2</sup>. Se midió la cinética de crecimiento de una única colonia derivada de las células de cordón umbilical en el paso 1. Durante 16 días, se recogieron células y se contaron diariamente y no se observaron cambios en la tasa de crecimiento. Los cambios en la morfología o el patrón de crecimiento de estas células madre/progenitores tampoco se verificó después de los 25 pasos.

Estas células mostraron un cariotipo normal en todas las líneas obtenidas y no pudieron observarse cambios después de 10 pasos.

#### Ejemplo 2 - Comparación del método de la invención con el método enzimático del estado de la técnica

Se aisló un cordón umbilical y se dividió en tres partes iguales (casi 5 cm). La primera parte se procesó según el ejemplo 1 y se transfirió directamente al medio de crecimiento. Las partes segunda y tercera se lavaron y se procesaron fragmentadas, tal como se describió, en el ejemplo 1, para luego tratarse con colagenasa (colagenasa al 0,1% durante dos horas) y TrypLE™ (durante 30 minutos), respectivamente. Puede observarse, en la figura 1, la diferencia entre las poblaciones celulares obtenidas por estos tres métodos, después de 72 horas en cultivo en A, B, C y después de 5 días en A1, B1 y C1. Puede observarse la diferencia en la morfología celular, que es más definida y fusiforme en A y A1, así como en la cantidad de células adheridas que empiezan a formar colonias. Se evaluó la proliferación de estas células sembrando en placa un número igual de células ( $10^3$  sobre 25 cm<sup>2</sup>), observándose que mientras que las células de la invención alcanzaron el 90% de confluencia con una cantidad de  $10^6$  células en 5 días y se congelaron, las células obtenidas mediante métodos enzimáticos alcanzaron solo el 70% de confluencia (véase la tabla 1 a continuación). No se contó el número de pasos durante la transferencia de fragmentos, por tanto, cada transferencia producirá células en el paso 0. Por tanto, teniendo en cuenta las múltiples transferencias de fragmentos, el número de células en un paso bajo (hasta P5 o paso 5) contadas como el paso límite sobre su uso terapéutico es prácticamente ilimitado.

Tabla 1 - Comparación de aspectos de la invención en relación con métodos enzimáticos alternativos de la figura 1.

Factores para la producción celular	No enzimático flotante según la invención	Colagenasa según el estado de la técnica	TrypLE™
Proliferación celular	mayor	alto	alto
Congelación de tejidos	posible	posible	posible
Congelación celular	posible	posible	posible
Número de pasos para terapia	ilimitado	limitado	limitado
Número de celdas	ilimitado	limitado	limitado
Producción a escala industrial para aplicación biotecnológica y terapéutica	ilimitado	limitado	limitado

5 Ejemplo 3 - Caracterización mediante citometría de flujo de células obtenidas según el procedimiento de invención, cultivadas *in vitro*.

10 Para el análisis mediante citometría de flujo, se usaron anticuerpos contra moléculas de la superficie celular y sus respectivos isotipos de control, tales como: anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano, (Sigma company, EE.UU.), CD90 (de BD-Pharmigen company, EE.UU.) y CD105, CD73 (de Serotec company, Reino Unido). Se incuban un millón de células con anticuerpos durante 30 minutos en hielo, se lavan con PBS que contiene suero bovino fetal al 2% y azida de sodio 1  $\mu\text{M}$ , seguido por adición de FITC (isotiocianato de fluoresceína) o PE (ficoeritrina). El análisis mediante citometría de flujo se realiza en un dispositivo FACS (citómetro de flujo activado por fluorescencia, de Becton, Dickson y Company, EE.UU.) usando el software CELLQuest (de Becton, Dickson and Company, EE.UU.).

15 La caracterización mediante citometría de flujo en el paso da a conocer que las células obtenidas según el procedimiento de la invención son positivas para marcadores de células madre mesenquimatosas.

20 Diferenciación *in vitro*

25 Para la diferenciación neuronal, se mantienen confluentes las células de la invención durante una semana en el frasco de cultivo de 25  $\text{cm}^2$ , que contiene medio DMEM complementado con suero inactivado al 20% (de Invitrogen company, EE.UU.), 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomina y L-glutamina 2 mM. Así, se recogen usando una disolución de tripsina al 0,05%/EDTA y se siembra en placa a alta densidad en placas de Petri de 35  $\text{cm}^2$  que contienen el mismo tipo de cultivo. La diferenciación neuronal también se induce mediante de ácido retinoico todo-trans (RA) (Sigma Company, EE.UU.). Se transfiere la suspensión de células de la invención obtenidas mediante tripsinización a una placa de Petri de 35  $\text{cm}^2$ , pretratada con disolución de agarosa al 0,1% (Sigma Company, EE.UU.) que contiene medio de cultivo neurobasal (Invitrogen Company, EE.UU.) complementado con B27. Después de 24 horas, las células forman estructuras esféricas y se induce la diferenciación neuronal mediante adición de RA (ácido retinoico) y DMSO (sulfóxido de dimetilo) a una concentración final de  $10^{-7}$  M y 0,05%, respectivamente, intercambiándose dicho medio diariamente. Después de cuatro días de cultivo en condiciones no adherentes, SLS se adhiere sobre las placas tratadas con gelatina al 0,1% que contienen un medio de cultivo adecuado.

35 Para la diferenciación adipogénica, se cultivaron células en medio DMEM con suero bovino fetal al 10%, isobutilmetilxantina 0,25 M, insulina 10  $\mu\text{M}$  y penicilina al 1%. Se llevó a cabo el intercambio del medio inductor cada 3 días y se mantuvo durante 20 días. Después de este periodo, se fijaron las células durante 60 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% y se lavaron algunas veces con etanol al 70%. En la siguiente etapa, se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos con rojo aceite O, se eliminó el exceso de colorante con algunos lavados con agua destilada. Las células muestran tinción positiva para Von Kossa.

40 Para la diferenciación condrogénica, se cultivaron células en medio DMEM con suero bovino fetal al 1%, insulina 6,25  $\mu\text{M}$ , 10 ng/ml de TGF- $\mu$ 1 y penicilina al 1%. Se llevó a cabo el intercambio del medio inductor cada 3 días y se mantuvo durante 21 días. Después de este periodo, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente y se tiñeron con azul alcian. La diferenciación condrogénica puede confirmarse mediante tinción específica para safranina y toluidina.



**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir células madre multipotentes y progenitores, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:  
5  
A - preparación previa de uno o más nichos de células madre naturales (NSCN) previamente obtenidos;  
B - preparación de fragmentos de tejido de uno o más NSCN;  
10  
C - promoción de la propagación de células madre (SC) y progenitores cultivando fragmentos flotantes de NSCN en un medio de cultivo basal;  
D - separación de SC a partir de fragmentos de NSCN;  
15  
E - opcionalmente, los fragmentos de NSCN separados en D se devuelven a la etapa C.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dichos NSCN son uno o más tejidos extraembrionarios originados en el parto, tejidos nerviosos, musculares, adiposos, óseos, cutáneos y derivados de órganos, tales como de hígado, pulmones, corazón, bazo, hígado, páncreas, testículos, ovarios, tejidos derivados de biopsias y tejido canceroso que tienen NSCN.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dichos NSCN son uno o más de cordón umbilical, placenta o amnios.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicha preparación previa de NSCN en la etapa A comprende uno o más de limpieza, lavado, cortes previos de tejidos, molienda, compresión y tratamiento previo suave con enzimas de disociación.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicha fragmentación en la etapa B se realiza con tejido de NSCN íntegro.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo en la etapa C contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de células contenidas en los NSCN, particularmente aminoácidos, proteínas, suero 30 y antibiótico(s).
- 35 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo en la etapa C se cambia tan frecuentemente como sea necesario para impedir el cambio de pH de ácido a alcalino.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los fragmentos en la etapa D se retiran mediante medios mecánicos.
- 40 9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que las células madre y los progenitores en la etapa D se separan de los fragmentos de tejido, se lavan y se retiran después de alcanzar un estado semiconfluyente, de entre el 70% y el 90%.
- 45 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los fragmentos de NSCN, separados después de dicha etapa D y devueltos a dicha etapa C, pueden mezclarse con fragmentos obtenidos según las etapas A y B.

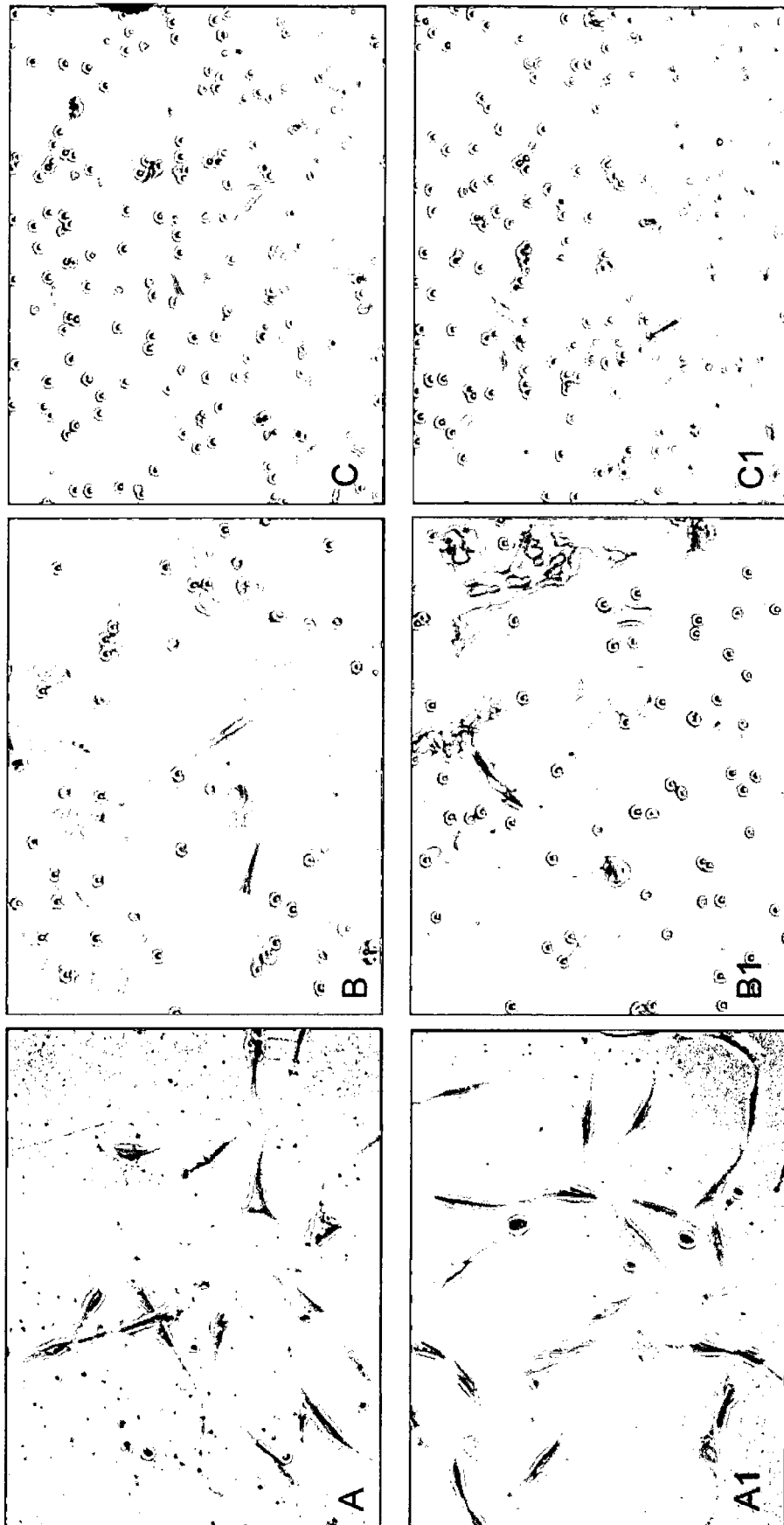


FIG. 1