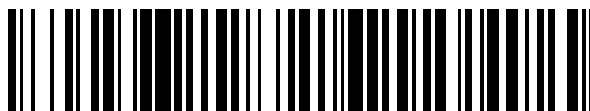


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 296**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2012 PCT/IB2012/000933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2012 E 12727416 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2697362**

54 Título: **Métodos y sistemas para recoger células**

30 Prioridad:

15.04.2011 US 201161475761 P

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

22.06.2020

73 Titular/es:

PLURISTEM LTD. (100.0%)

Matam Building 20

31905 Haifa, IL

72 Inventor/es:

KASUTO, HAREL;

DRORI-CARMI, NIRIT y

ZOHAR, BARAK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 768 296 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

Métodos y sistemas para recoger células

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y sistemas para recoger células que han crecido en cultivo. Más en particular, la invención se refiere a métodos y sistemas para recoger células cultivadas *in vitro* en un sustrato tridimensional ("3D") aplicando una fuerza vibratoria de frecuencia, amplitud y duración suficientes para liberar las células de la matriz 3D de modo que puedan recuperarse con alto rendimiento y alta viabilidad y vitalidad celular. La fuerza vibratoria también se puede usar para sembrar células en la matriz antes del crecimiento y también para mezclar eficazmente medios a través de la matriz 3D durante el crecimiento de las células en un sistema de biorreactor 3D.

Las poblaciones de células, tales como células de mamíferos o humanas, son cada vez más importantes en la medicina como agentes biológicos útiles para tratar una diversidad de diferentes afecciones médicas. Por ejemplo, ha habido un interés considerable centrado en el potencial terapéutico de las células humanas para diversas aplicaciones médicas, incluyendo la reparación de tejidos de órganos dañados tales como el cerebro, el corazón, el hueso y el hígado, y para apoyar el trasplante de médula ósea (TMO). Una clase de células humanas, células madre adultas, se han evaluado para tratar y curar diversas afecciones, tales como trastornos hematopoyéticos, cardiopatía, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus, quemaduras, distrofia muscular, trastornos autoinmunitarios, diabetes y artritis.

Otra clase de células humanas de interés son células estromales adherentes ("ASC"). Las ASC son poblaciones heterogéneas de células que se pueden obtener de la médula ósea, el tejido adiposo, la placenta o la sangre. Se describen ASC y su uso en la propagación de células madre hematopoyéticas *in vitro* en la patente de los Estados Unidos N° 6.911.201.

Debido a sus diversos usos médicos para fines tanto clínicos como de investigación, existe una creciente necesidad de ASC en grandes cantidades. Existen obstáculos para el uso de estas células en la dificultad técnica de aislar grandes cantidades de poblaciones de células estromales adherentes que aparecen normalmente debido a la cantidad limitada de estas células en la mayoría de los tejidos y la incomodidad y el riesgo implicados en los procedimientos para obtener ASC.

Una solución al problema de los números limitados de ASC es cultivar las células *in vitro* en un sistema de cultivo 3D en condiciones que permiten la expansión de las células. El documento WO 2007/108003 desvela métodos para la expansión de ASC por cultivo en un biorreactor 3D y el uso de las células en terapia. La expansión de ASC por cultivo *in vitro* en una matriz 3D también se desvela en el documento WO 2010/026575. En cada una de estas referencias, después del cultivo de las ASC en una matriz 3D, las células se recogen usando un procedimiento que implica múltiples lavados de las células y la matriz con tampón, seguido de la liberación de las células de la matriz exponiendo las células a una solución de tripsina EDTA con agitación suave.

Aunque el procedimiento de recogida descrito en estas referencias permite recuperar ASC expandidas de una matriz 3D, las características de la matriz conducen a ineficacias en el proceso. Una ventaja de una matriz 3D es que proporciona un microambiente tridimensional en el que las células que se cultivan pueden imitar mejor sus homólogos *in vivo*. Aunque los microambientes 3D en la matriz promueven el crecimiento y la proliferación de las células cultivadas, también proporcionan espacios interiores de los que es difícil desalojar células en el proceso de recogida. Esta dificultad se agrava por la presencia de macromoléculas extracelulares secretadas por las células cultivadas que actúan para unir las células a la superficie de la matriz.

Spier *et al.* (Biotechnology and Bioengineering XIX (1977) 1735-1738) describen métodos usados para recoger un propagador de células de esfera de vidrio de 10 litros mediante el uso de una mesa vibratoria para transmitir algo de movimiento a las esferas de vidrio en presencia de tripsina.

En consecuencia, existe la necesidad de métodos de recogida de células que mejoren la eficacia de recuperación celular de las matrices 3D usadas en biorreactores.

Sumario de la invención

Según un aspecto, se proporcionan métodos para recoger células que han crecido en cultivo que comprenden cultivar las células en un material adherente, en donde las células se unen al material adherente y el material adherente se mantiene en una cesta que está dentro de un recipiente, disociar las células del material adherente exponiéndolas a un agente de disociación, hacer vibrar el material adherente durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para liberar las células del material adherente y recuperar las células; en donde la cesta incluye una pared ubicada perpendicularmente a una pantalla superior y una pantalla inferior, teniendo cada pantalla perforaciones en las mismas; en donde la cesta está unida operativamente a un vibrador configurado para transmitir movimiento vibratorio a la cesta y su contenido; y en donde el material adherente proporciona una matriz tridimensional a la que

se unen las células. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además hacer vibrar el material adherente durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para retirar las células liberadas del material.

5 En algunas realizaciones, la matriz tridimensional está incluida en un lecho empaquetado dentro de un biorreactor. En algunas realizaciones, la matriz tridimensional comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas. En otras realizaciones, las perlas son lisas o porosas. En otras realizaciones más, las microfibras o nanofibras no son tejidas.

10 En algunas realizaciones, el material adherente comprende uno o más de un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona, un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli L láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón, vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal. En realizaciones
15 particulares, la celulosa es acetato de celulosa. En otras realizaciones, el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina. En algunas realizaciones, el material adherente tiene carga electrostática. En algunas realizaciones, el material adherente está recubierto con colágeno o gelatina.

20 En algunas realizaciones del método, el agente de disociación es tripsina, papaína, elastasa, hialuronidasa, colagenasa de tipo 1, colagenasa de tipo 2, colagenasa de tipo 3, colagenasa de tipo 4, dispasa o una combinación de las mismas. En realizaciones particulares, la tripsina es tripsina recombinante.

25 En algunas realizaciones, las células son células humanas. En algunas realizaciones, las células humanas son células adherentes. En otras realizaciones más, las células adherentes son células estromales adherentes. En algunas realizaciones, el origen de las células estromales adherentes es la placenta, el tejido adiposo o la médula ósea. En realizaciones particulares, el origen de las células estromales adherentes es la placenta. En algunas realizaciones, las células estromales adherentes se obtienen de una o ambas de las partes fetales o maternas de la placenta.

30 En algunas realizaciones, el material adherente se hace vibrar por un movimiento oscilante sustancialmente lineal. En otras realizaciones más, el movimiento oscilante tiene una amplitud de entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 750 mm y una frecuencia de 3 a 6 Hz. En otras realizaciones, la duración del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 segundo, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 20 minutos. En otras realizaciones más, la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 5 Hz y la duración es de aproximadamente 30 segundos o menos. En algunas realizaciones, la amplitud es de
35 aproximadamente 25 mm. En otras realizaciones, la amplitud del movimiento oscilante sustancialmente lineal es una distancia que es 15-100 % de la altura de una cesta que contiene el material adherente.

40 En algunas realizaciones, las células recogidas se caracterizan por uno o más de: a) al menos 50 % de la viabilidad celular; b) al menos 50 % de la eficacia de recogida; c) un índice de vitalidad menor de o igual a 0,5; o d) una población celular heterogénea. Otras realizaciones comprenden células recogidas por cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.

45 En otro aspecto, se proporciona un método para sembrar células en una matriz tridimensional en un biorreactor que comprende proporcionar una matriz tridimensional en un líquido dentro de un recipiente del biorreactor, introducir una composición que comprende células en el recipiente, hacer vibrar la matriz durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para mezclar las células por toda la matriz y detener la vibración para permitir que las células se unan a la matriz. En algunas realizaciones, el líquido es un medio de cultivo. En otras realizaciones, los métodos comprenden además cultivar las células en el biorreactor aplicando vibración intermitente a la matriz durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para mezclar el medio de cultivo por toda la matriz.

50 En algunas realizaciones, la matriz tridimensional está incluida en un lecho empaquetado dentro de un biorreactor. En algunas realizaciones adicionales, la matriz tridimensional comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras o combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas. En otras realizaciones, las perlas son lisas o porosas.

55 En algunas realizaciones, la matriz tridimensional comprende un material adherente. En algunas realizaciones, el material adherente comprende uno o más de un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona, un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli L láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón,
60 vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal. En realizaciones particulares, la celulosa es acetato de celulosa. En otras realizaciones, el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina. En algunas realizaciones, el material adherente tiene carga electrostática. En algunas realizaciones, el material adherente está recubierto con colágeno o gelatina.

65 En algunas realizaciones, las células sembradas son células humanas. En algunas realizaciones, las células humanas

son células adherentes. En otras realizaciones más, las células adherentes son células estromales adherentes. En algunas realizaciones, el origen de las células estromales adherentes es la placenta, el tejido adiposo o la médula ósea. En realizaciones particulares, el origen de las células estromales adherentes es la placenta. En algunas realizaciones, las células estromales adherentes se obtienen de una o ambas de las partes fetales o maternas de la placenta.

En algunas realizaciones, la matriz tridimensional se hace vibrar por un movimiento oscilante sustancialmente lineal. En otras realizaciones más, el movimiento oscilante tiene una amplitud de entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 750 mm y una frecuencia de 1 a 3 Hz. En otras realizaciones, la duración del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 segundo, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 20 minutos. En otras realizaciones más, la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 Hz y la duración es de aproximadamente 30 segundos o menos. En algunas realizaciones, la amplitud es de aproximadamente 25 mm. En otras realizaciones, la amplitud del movimiento oscilante sustancialmente lineal es una distancia que es 15-100 % de la altura de una cesta que contiene el material adherente.

Otra realización es un aparato que comprende un material adherente contenido en una cesta que está dentro de un recipiente y un vibrador para transmitir un movimiento oscilante al material adherente, comprendiendo el vibrador uno o más controles para ajustar la amplitud y la frecuencia del movimiento oscilante, en donde el vibrador está configurado para vibrar de una manera que provoca que las células unidas al material adherente se desprendan del material adherente, en donde la cesta incluye una pared ubicada perpendicularmente a una pantalla superior y una pantalla inferior, teniendo cada pantalla perforaciones en las mismas; en donde la cesta está unida operativamente al vibrador configurado para transmitir movimiento vibratorio a la cesta y su contenido; y en donde el material adherente es una matriz 3D.

En algunas realizaciones, el aparato es un biorreactor. En realizaciones particulares, el biorreactor es un biorreactor de flujo de tapón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de agitación por aire o una perfusión de siembra celular. En algunas realizaciones, el biorreactor es un biorreactor de flujo de tapón que comprende una matriz tridimensional de lecho empacado y el dispositivo oscilante comprende una cesta que envuelve sustancialmente el lecho empacado.

En algunas realizaciones del aparato, la matriz tridimensional comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras o combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas. En otras realizaciones, las perlas son lisas o porosas. En algunas realizaciones del aparato, la matriz tridimensional comprende uno o más de un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona, un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli L láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón, vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal.

En realizaciones particulares, la celulosa es acetato de celulosa. En otras realizaciones, el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina. En algunas realizaciones, el material adherente tiene carga electrostática. En algunas realizaciones, el material adherente está recubierto con colágeno o gelatina.

En algunas realizaciones, el aparato comprende además células. En algunas realizaciones, las células son células humanas. En algunas realizaciones, las células humanas son células adherentes. En otras realizaciones más, las células adherentes son células estromales adherentes. En algunas realizaciones, el origen de las células estromales adherentes es la placenta, el tejido adiposo o la médula ósea. En realizaciones particulares, el origen de las células estromales adherentes es la placenta. En algunas realizaciones, las células estromales adherentes se obtienen de una o ambas de las partes fetales o maternas de la placenta.

En algunas realizaciones, el vibrador del aparato transmite un movimiento oscilante sustancialmente lineal al material adherente. En otras realizaciones más, el movimiento oscilante tiene una amplitud de entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 750 mm y una frecuencia de 1 a 6 Hz. En otras realizaciones, la duración del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 segundo, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 20 minutos. En otras realizaciones más, la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 5 Hz y la duración es de aproximadamente 30 segundos o menos. En otras realizaciones, la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 Hz. En algunas realizaciones, la amplitud es de aproximadamente 25 mm. En otras realizaciones, la amplitud del movimiento oscilante sustancialmente lineal es una distancia que es 15-100 % de la altura de una cesta que contiene el material adherente.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en el presente documento, únicamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que las particularidades mostradas son únicamente a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente

invención y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se realiza ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo la descripción tomada con los dibujos evidente para los expertos en la materia cómo las múltiples formas de la invención se pueden implementar en la práctica.

En los dibujos:

Las figuras 1A y 1B ilustran una realización de un reactor con la cesta que contiene la matriz 3D. Esta realización de sistema abierto se usa solo para la etapa de recogida.

La figura 2 ilustra otra realización del reactor con la cesta. Esta realización de sistema cerrado se usa para la etapa tanto de cultivo como de recogida.

La figura 3 es otra realización que ilustra el reactor con la cesta para su uso en un sistema cerrado.

La figura 4A ilustra una realización del diseño de cesta que muestra una cesta sin las paredes externas integrales.

La figura 4B es una vista en corte de la figura 4C que muestra otra realización de un diseño de cesta que ilustra una cesta con la pared externa integral.

La figura 5 es una vista lateral de una realización del reactor que ilustra las barras y fuelles de la cesta que cooperan en el movimiento oscilante de la cesta dentro del reactor.

La figura 6 ilustra una vista en corte de una parte del reactor con una cesta que demuestra una realización de un mecanismo de cierre hermético.

La figura 7 es otra realización del diseño de reactor y cesta con una vista en corte que ilustra el diseño de cierre hermético de barra que coopera con los medios oscilantes para mover la cesta.

La figura 8 es una realización que ilustra el dispositivo oscilante para hacer oscilar la cesta.

Las figuras 9A, 9B, 9C y 9D son diversas vistas superiores de una realización del dispositivo oscilante.

La figura 10 muestra datos de concentración celular para células recogidas por vibración en diferentes condiciones de amplitud y frecuencia de vibración como se expone en la tabla 1.

La figura 11 muestra datos de concentración celular para células recogidas de vehículos 3D por vibración (amplitud de 25 mm, 6 Hz, 1 minuto) en un sistema abierto.

La figura 12 muestra la eficacia de recogida de vehículos según lo determinado basándose en la densidad óptica usando el ensayo de MTT. Los vehículos se hicieron vibrar a una amplitud de 25 mm, 6 Hz durante 20 minutos para desprender las células, produciendo una eficacia de recogida del 98 %.

La figura 13 muestra datos de concentración celular para células recogidas de vehículos 3D por vibración (amplitud de 25 mm durante 1 minuto) a frecuencias de 3 o 6 Hz.

La figura 14 muestra la eficacia de recogida de vehículos según lo determinado basándose en la densidad óptica usando el ensayo de MTT. Los vehículos se hicieron vibrar a una amplitud de 25 mm durante 1 minuto a 3 o 6 Hz para desprender las células. La eficacia de recogida a 3 Hz fue del 46 %, mientras que la eficiencia de recogida a 6 Hz fue del 79 %.

La figura 15 muestra el índice de vitalidad para células recogidas de vehículos 3D por vibración usando una frecuencia de 3 o 6 Hz.

La figura 16 muestra la eficacia de recogida de vehículos según lo determinado basándose en la densidad óptica usando el ensayo de MTT. Se recogieron células de los vehículos ya sea por agitación (14 % de eficacia) o vibración (87 % de eficacia).

La figura 17 muestra la viabilidad de células recogidas ya sea por agitación o vibración después de crioconservación.

La figura 18 muestra el índice de vitalidad después de la descongelación para células que se recogieron por agitación o vibración.

La figura 19 demuestra una correlación positiva entre la frecuencia de vibración y la eficacia de recogida según lo medido por valores de capacidad. La mayor eficacia de recogida se obtuvo usando una frecuencia de 5 Hz.

La figura 20 muestra la eficacia de recogida para células recogidas por vibración con muestreo de vehículos tomados de diferentes posiciones dentro de la cesta que contiene los vehículos.

La figura 21 muestra la eficacia de recogida obtenida para células recogidas por vibración usando dos cestas diferentes para los vehículos 3D.

La figura 22 muestra concentraciones celulares (medidas como valores de capacidad) en función de la duración de la vibración para células recogidas por vibración usando una frecuencia de 5 Hz.

La figura 23 muestra concentraciones celulares en función de la duración de la vibración para células recogidas por vibración usando una frecuencia de 5 Hz.

La figura 24 muestra la eficacia de recogida para células recogidas por vibración con muestreo de vehículos tomados de diferentes posiciones dentro de la cesta que contiene los vehículos.

La figura 25 muestra un índice de vitalidad para células recogidas por vibración con una duración de vibración que dura hasta 120 segundos.

Descripción detallada de realizaciones

En una realización, esta memoria descriptiva describe un método para usar vibración, por ejemplo, vibración resultante de un movimiento oscilante controlado sustancialmente lineal, para recoger células cultivadas *in vitro*. En particular, las células se cultivan en una superficie adherente, que es una matriz tridimensional. Los inventores han reconocido

que al aplicar un movimiento oscilante adecuado que se controla tanto para amplitud como para frecuencia las células que crecen unidas al material adherente se desprenden con alta eficacia, lo que da como resultado la recuperación de mayores cantidades de células en comparación con los métodos existentes para recoger células que se conocen en la técnica. En otra realización, esta memoria descriptiva describe usar vibración controlada para facilitar la siembra de células en un material adherente antes de su cultivo en un sistema *in vitro*, por ejemplo, un biorreactor. También se describe el uso de vibración controlada para facilitar la mezcla del medio de cultivo por todo un material adherente cultivando al mismo tiempo células *in vitro*. Por tanto, una realización desvelada en esta memoria descriptiva es un aparato que proporciona un sistema cerrado, por ejemplo, un biorreactor configurado con un dispositivo para transmitir un movimiento oscilante a un recipiente que contiene el material adherente, de modo que los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en un solo dispositivo. En otra realización, se describe un sistema abierto, que se usa para recoger células que se han cultivado *in vitro* en un material adherente. En otra realización, la memoria descriptiva desvela un aparato para realizar los métodos descritos en el presente documento.

Los principios y la operación de la presente invención pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas. Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son para el fin de describir y no deberían interpretarse como limitantes.

Sin quedar ligado a teoría alguna, los inventores han descubierto que la fuerza transmitida por vibración, por ejemplo, un movimiento oscilante que es controlado y sustancialmente lineal, se puede usar para recuperar células cultivadas en un material adherente, tal como una matriz 3D, como se usa convencionalmente en sistemas de biorreactor para cultivar células *in vitro*. Han descubierto que la separación mecánica de las células de dichos vehículos se ve afectada por dos fuerzas principales:

1. Vibración de alta frecuencia (3-6 Hz), que genera un momento elevado en los vehículos que libera las células de la matriz porosa de los vehículos.
2. Vibración de baja frecuencia (1-3 Hz) que genera suficiente circulación dentro y fuera de los vehículos, permitiendo de este modo mezcla muy eficaz con bajas fuerzas de corte.

Los inventores también han descubierto que la mezcla uniforme que resulta de vibración de baja frecuencia permite sembrar células en vehículos y también cultivar células de manera eficaz en los vehículos.

Es convencional en la técnica usar una turbina o dispositivo similar para proporcionar agitación y desprender de este modo las células de un material adherente. Sin embargo, las fuerzas de corte transmitidas por el flujo circular que surge del uso de una turbina pueden dañar las células cultivadas. Los inventores han descubierto que al usar un movimiento oscilante controlado pueden minimizar las fuerzas de corte transmitidas a las células aumentando al mismo tiempo la eficacia de recogida de células de un material adherente. En algunas realizaciones, el uso de una mayor amplitud de movimiento combinada con una menor frecuencia proporciona la liberación más eficaz de células del material adherente conservando al mismo tiempo la integridad y viabilidad de las células liberadas. La amplitud y frecuencia de vibración óptimas para usar para un tipo celular, material adherente y biorreactor particulares variarán, sin embargo, el experto en la materia puede determinar fácilmente las condiciones adecuadas para recoger células usando vibración mediante prueba y error rutinarios, dada la enseñanza de esta memoria descriptiva.

Las condiciones necesarias para recoger células usando un movimiento vibratorio variarán dependiendo de la naturaleza del material adherente y pueden determinarse fácilmente en función de la enseñanza de esta memoria descriptiva. Por ejemplo, a diferencia de la recogida de células de un material adherente 2D en el que los únicos puntos de unión que se rompen se encuentran entre las células y el recipiente en el que crecen las células, al recoger células de un material adherente 3D, también es necesario desprender las células de la matriz extracelular que se forma de una manera que depende de los parámetros de crecimiento en el sistema de cultivo. Por ejemplo, un periodo de crecimiento prolongado dará como resultado la formación de más matriz extracelular y requerirá diferentes condiciones de recogida en comparación con un periodo de crecimiento más corto. En consecuencia, el aparato usado para transmitir el movimiento oscilante al material adherente debe ser controlable de modo que la amplitud, frecuencia y duración del movimiento oscilante pueden ajustarse para proporcionar una recogida eficaz de células para cualquier condición de crecimiento dada, limitando también al mismo tiempo el potencial de daño a las células que surge de las fuerzas generadas por el movimiento oscilante. Con respecto al daño celular potencial, los métodos descritos en esta memoria descriptiva proporcionan una ventaja sobre los métodos convencionales en la técnica porque se aplican fuerzas a las células durante un tiempo más corto, reduciendo de este modo la cantidad de tensión a la que se exponen las células durante cultivo *in vitro* y, en particular, durante la recogida.

La realización de "sistema cerrado" descrita en el presente documento, que permite sembrar, cultivar y recoger las células en un aparato o sistema de biorreactor, proporciona una ventaja significativa con respecto a eficacia y en minimizar el potencial de contaminación de las células recogidas al permitir que todas las etapas se realicen en un dispositivo.

5 En una realización, se proporciona un método para recoger células expandidas por cultivo en un sistema de cultivo 3D, más en particular, células de mamífero adherentes expandidas, por ejemplo, células de la placenta, el tejido adiposo o la médula ósea. En algunas realizaciones, las células se siembran en la matriz 3D usando vibración para distribuir las células dentro de la matriz. En una realización, se usa vibración después de sembrar las células dentro de la matriz para hacer circular el medio de cultivo a través de la matriz.

10 Como se usa en el presente documento, las expresiones "*en expansión*" y "*expansión*" se refieren al crecimiento celular, es decir, aumento de una población celular (por ejemplo, al menos el doble) con o sin diferenciación que acompañe a dicho aumento.

15 Como se usa en el presente documento, "células" se refiere a cualquier célula de mamífero que se pueda cultivar *in vitro*. En determinadas realizaciones, las células son humanas.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "*células adherentes*" se refiere a una población homogénea o heterogénea de células que dependen del anclaje, es decir, requieren fijación a una superficie para crecer *in vitro*.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "*tejido adiposo*" se refiere a un tejido conectivo que comprende células grasas (adipocitos).

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "*tejido placentario*" se refiere a cualquier parte del órgano femenino de mamíferos que reviste la pared uterina y durante el embarazo envuelve al feto, al que está unido por el cordón umbilical. Después del nacimiento, se expulsa la placenta (y se denomina placenta posparto).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "*condiciones de cultivo tridimensionales*" se refiere a un cultivo en el que las células se cultivan en condiciones que son compatibles con el crecimiento celular y que incluyen una matriz que permite el crecimiento celular en tres dimensiones. Está bien reconocido que el ambiente *in situ* de una célula en un organismo vivo (o un tejido) tiene una arquitectura tridimensional. Las células están rodeadas por otras células. Se mantienen en una red compleja de fibras de nanoescala de matriz extracelular que permite el establecimiento de diversos microambientes locales. Sus ligandos extracelulares median no solo en la unión a la membrana basal, sino también en el acceso a una diversidad de vasos vasculares y linfáticos. Se transportan oxígeno, hormonas y nutrientes a las células y se retiran los productos de desecho.

40 En algunas realizaciones, el material adherente se configura para cultivo 3D, proporcionando de este modo una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células a fin de imitar la infraestructura del tejido (p. ej., placenta).

45 En otras realizaciones, las fibras en la matriz 3D forman un volumen de poro como porcentaje del volumen total de 40 a 95 % y un tamaño de poro de 10 micrómetros a 400 micrómetros. En otra realización, la matriz tiene un volumen de poro como porcentaje del volumen total de 60 a 95 %.

50 Como se usa en el presente documento, "*sembrar*" significa el proceso de introducir células en el material adherente, por ejemplo, una matriz 3D, de modo que las células se puedan unir al material. En algunas realizaciones, la etapa de sembrar las células en el biorreactor, por ejemplo, un biorreactor de flujo de tapón de fase estacionaria, se efectúa mientras el flujo en el biorreactor se cierra durante al menos 10 horas después de la siembra. En otras realizaciones, se promueve la siembra de las células aplicando una vibración de baja frecuencia, por ejemplo, a aproximadamente 1 a 3 Hz, al recipiente que contiene el material adherente de modo que el medio en el recipiente circule dentro del material adherente.

55 Como se usa en el presente documento, "recoger" significa eliminar células de un vehículo bidimensional o tridimensional.

60 En algunas realizaciones para recoger las células, los materiales adherentes se lavan primero (p. ej., 2-3 veces) con una solución salina o solución comparable. Después de la etapa de lavado, se puede realizar una etapa de disociación sobre el material adherente. En un ejemplo, se emplea una enzima de disociación adecuada durante la etapa de disociación.

65 En otra realización, los materiales adherentes lavados se lavan en el biorreactor. Como ya se ha mencionado, este se denomina sistema cerrado. En otra realización más, los materiales adherentes sobre los que se han cultivado las células se transfieren a la cesta del sistema de recogida y la cesta se coloca en un recipiente que contiene una enzima de disociación adecuada o al que se añade una enzima de disociación adecuada. Este es un "*sistema abierto*".

70 En otra realización, los materiales adherentes se lavan antes y/o durante la oscilación de la cesta del biorreactor que contiene los vehículos. En otra realización más, la cesta se hace oscilar durante la etapa de lavado completa, intermitentemente durante el ciclo de lavado y/o al principio o al final del ciclo de lavado. En otra realización más, la cesta se hace oscilar durante la etapa de disociación completa, intermitentemente durante el ciclo de disociación (p. ej., ciclos de 1 o 2 o 3 o 4 minutos) y/o al principio o al final del ciclo de disociación.

En una realización, el lecho empaquetado se hace oscilar mientras se mantiene simultáneamente el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos uno de los siguientes: a) al menos 80 % de la viabilidad celular (por el método descrito en los ejemplos a continuación); a) al menos 80 % de la eficacia de recogida (por el método descrito en los ejemplos a continuación); c) índice de vitalidad menor o igual a 0,5 (por el método descrito en los ejemplos a continuación); y/o d) conservación de la composición heterogénea de la población celular (de modo que la población heterogénea de la población celular en la etapa de cultivo es sustancialmente similar a la población heterogénea de la población celular en la etapa de recogida. En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar en un movimiento sustancialmente lineal a una amplitud, frecuencia y duración suficientes para liberar las células del material adherente.

En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 70 % de viabilidad celular (por el método descrito en los ejemplos a continuación). En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 60 % de viabilidad celular (por el método descrito en los ejemplos a continuación). En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 50 % de viabilidad celular (por el método descrito en los ejemplos a continuación).

En otra realización más, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 70 % de eficacia de recogida (por el método descrito en los ejemplos a continuación). En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 60 % de eficacia de recogida (por el método descrito en los ejemplos a continuación). En otra realización, el lecho empaquetado se hace oscilar manteniendo al mismo tiempo de manera simultánea el lecho empaquetado en una condición sustancialmente estática para dar como resultado al menos 50 % de eficacia de recogida (por el método descrito en los ejemplos a continuación).

En algunas realizaciones, la condición oscilante para la cesta del biorreactor es una amplitud de aproximadamente 10 mm a aproximadamente 750 mm (o cualquier valor integral dentro de este intervalo). En otra realización más, la condición oscilante para la cesta del biorreactor es una frecuencia de aproximadamente 3 - 6 Hz (p. ej., 4, 5) o mayor. En otra realización, las dimensiones del biorreactor pueden ser de 5 litros con un diámetro de aproximadamente 140 mm y una altura de 90 mm. En otra realización, las dimensiones del biorreactor pueden ser de 14 litros con un diámetro de aproximadamente 200 mm y una altura de 130 mm. En otra realización, la dimensión del biorreactor puede ser de 75 litros. En otras realizaciones, la dimensión del biorreactor puede ser de 150 litros. En otra realización, la condición oscilante para la cesta del biorreactor es una amplitud del 15-100 % de la altura de la cesta. En otra realización, la cesta se hizo oscilar durante aproximadamente 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 20 minutos o más.

Se pueden obtener células estromales adherentes procedentes de placenta de partes tanto fetales (es decir, amnios o corion) como maternas (es decir, decidua basal y decidua parietal) de la placenta. Por tanto, las células estromales adherentes "maternas" de una placenta comprenden al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de células de una parte materna de placenta. De manera similar, las células estromales adherentes "fetales" comprenden al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de células adherentes de una parte fetal de placenta.

Como se usa en el presente documento, un "agente de disociación" es cualquier compuesto que actúe para romper puntos de unión entre una célula y una superficie a la que está unida la célula. En algunas realizaciones, el agente de disociación es una enzima. En realizaciones particulares, la enzima es tripsina, incluyendo tripsina recombinante, papaína, elastasa, hialuronidasa, colagenasa de tipo 1, colagenasa de tipo 2, colagenasa de tipo 3, colagenasa de tipo 4 o dispasa.

Se describen métodos para preparar y caracterizar células estromales adherentes de origen materno y de origen fetal en el documento WO 2011/064669. En algunas realizaciones, las células estromales adherentes placentarias maternas y fetales se identifican en función del análisis de genotipo y/o cariotipo (p. ej., FISH o bandas G). Por ejemplo, las células estromales adherentes de una placenta de un feto masculino se pueden separar en células fetales y maternas en función del análisis de cariotipo (es decir, las células XX son maternas, mientras que las células XY son fetales). En algunas realizaciones, las células estromales adherentes procedentes de una parte fetal de la placenta (p. ej., que consiste en o comprende vellosidades coriónicas) expresan CD200. Es decir, al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de las células expresan CD200 según lo medido por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa. En algunas realizaciones, no más del 3,5 %, no más del 3 %, no más del 2 % o no más del 1 % de las células estromales adherentes de una parte materna expresan CD200 según lo medido por citometría de flujo usando un control de isotipo para definir la expresión negativa.

Independientemente de si se preparan células adherentes placentarias de origen materno, fetal o mixto materno y

fetal, las muestras de ensayo tisulares se lavan en un tampón fisiológico [p. ej., solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Hank]. Se realizan suspensiones de células individuales tratando el tejido con una enzima digestiva (véase posteriormente) y/o picando y lavando las partes de tejido a través de un filtro de nailon o mediante pipeteo suave (Falcon, Becton, Dickinson, San José, CA) con medio de lavado.

Las células estromales adherentes procedentes de tejido adiposo pueden aislarse mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos métodos se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 6.153.432. El tejido adiposo puede proceder de sitios de tejido omental/visceral, mamario, gonadal u otros de tejido adiposo. Una fuente preferida de tejido adiposo es el adiposo omental. En seres humanos, el adiposo se aísla normalmente por liposucción.

Las células estromales adherentes aisladas del tejido adiposo pueden obtenerse tratando el tejido con una enzima digestiva tal como colagenasa, tripsina y/o dispasa; y/o concentraciones eficaces de hialuronidasa o DNasa; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); a temperaturas entre 25 y 50 °C, durante periodos de entre 10 minutos y 3 horas. Las células pueden pasarse después a través de un filtro de malla de nylon o estopilla de entre 20 micrómetros y 800 micrómetros. Después, las células se someten a centrifugación diferencial directamente en medios o sobre un gradiente de Ficoll o Percoll u otras partículas. Las células se centrifugan a velocidades de entre 100 y 3000 xg durante periodos de entre 1 minuto y 1 hora a temperaturas de entre 4 y 50 °C (véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 7.078.230).

Además de las células estromales adherentes procedentes de placenta o tejido adiposo, se pueden usar células estromales adherentes de otras fuentes celulares. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las células estromales adherentes se obtienen de médula ósea. Otras fuentes tisulares de las que se pueden recuperar células estromales adherentes incluyen, pero sin limitación, sangre de cordón umbilical, folículos pilosos [p. ej., como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos 20060172304], testículos [p. ej., como se describe en Guan K., *et al.*, Nature. 27 de abril de 2006; 440 (7088): 1199-203], mucosa olfativa humana [p. ej., como se describe en Marshall, CT., *et al.*, Histol Histopathol. Jun de 2006; 21 (6): 633-43] y líquido amniótico [Pietemella *et al.* (2004) Stem Cells 22: 1338-1345]. Las células estromales adherentes de estas fuentes tisulares pueden aislarse cultivando las células en una superficie adherente, aislando de este modo células estromales adherentes de otras células en la población inicial, que después se recogen según los métodos descritos en el presente documento.

Independientemente del origen (p. ej., placenta, tejido adiposo o médula ósea), la recuperación de células se realiza en general en condiciones estériles. Una vez que se han obtenido células aisladas, se permite que se adhieran a un material adherente (p. ej., configurado como una superficie) para aislar de este modo células estromales adherentes. Esto puede efectuarse antes o simultáneamente con cultivo en condiciones de cultivo 3D.

Como se usa en el presente documento, "*un material adherente*" se refiere a uno sintético, de origen natural o una combinación de los mismos, de un material no citotóxico (es decir, biológicamente compatible) que tiene una estructura química (p. ej., grupos expuestos en superficie con carga) que pueden retener las células en una superficie.

Los ejemplos de materiales adherentes que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona, un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli-L-láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón, vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal. En determinadas realizaciones, la celulosa es acetato de celulosa. En otras realizaciones, el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina. En otras realizaciones adicionales, el material adherente tiene carga electrostática. En otras realizaciones, el material adherente está recubierto con colágeno o gelatina.

En un ejemplo específico, el material adherente es discos Fibra-Cel® (New Brunswick Scientific). Los discos Fibra-Cel están compuestos de fibra de poliéster no tejida y polipropileno. Los discos Fibra-Cel también se tratan electrostáticamente para facilitar que las células se adhieran a los discos y se inmovilicen en el sistema de fibra, donde permanecen durante todo el proceso. Los discos Fibra-Cel® tienen un área superficial por gramo de 1200 cm² y un diámetro de disco de 6 mm.

Los ejemplos no limitantes de medios de base útiles en el cultivo según la presente invención incluyen medio esencial mínimo Eagle, ADC-I, LPM (sin seroalbúmina bovina), FIO (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con y sin modificación de Fitton-Jackson), medio basal Eagle (BME-con adición de base de sal de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, medio de Eagle con modificación de Glasgow (GMEM), medio Leibovitz L-15, medio 5A de McCoy, medio M199 (M199E-con base de sal de Earle), medio M 199 (M 199H-con base de sal de Hank), medio mínimo esencial Eagle (MEM-E-con base de sal de Earle), medio esencial mínimo Eagle (MEM-H-con base de sal de Hank) y medio esencial mínimo Eagle (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre muchos otros, incluyendo medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams' G, Neuman y Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferido para su uso en la presente invención es DMEM. Estos y otros medios

útiles están disponibles de GIBCO, Grand Island, N. Y., Estados Unidos y Biological Industries, Bet HaEmek, Israel, entre otros. Varios de estos medios se resumen en *Methods in Enzymology*, volumen LVIII, "Cell Culture", págs. 62 72, editado por William B. Jakoby e Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc.

5 El medio puede complementarse, por ejemplo, con suero tal como suero fetal de especies bovinas u otras, y opcionalmente o como alternativa complementarse con factores de crecimiento, citocinas y/u hormonas (p. ej., hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 7, factor estimulante de colonias de macrófagos, ligando c-kit/factor de células madre, ligando de osteoprotegerina, insulina, factores insulínicos de crecimiento, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteína morfogenética ósea a concentraciones de niveles entre picogramos/ml y miligramos/ml.

10 Se reconoce además que pueden añadirse componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células.

15 Las células estromales adherentes pueden propagarse *in vitro* por condiciones de cultivo bidimensional (2D) convencionales o en condiciones de cultivo tridimensional (3D). La expresión "cultivo bidimensional" o "2D" se refiere a un cultivo en el que las células crecen principalmente en un plano, como en una placa de cultivo tisular.

20 Una vez que están disponibles células estromales adherentes, pueden pasarse a configuraciones tridimensionales. Sin embargo, se apreciará que las células pueden transferirse a una matriz configurada en 3D inmediatamente después del aislamiento. Por tanto, el material adherente del aspecto 3D de la presente invención se configura para cultivo 3D, proporcionando de este modo una matriz de crecimiento que aumenta sustancialmente la superficie de unión disponible para la adherencia de las células estromales adherentes a fin de imitar la infraestructura del tejido (p. ej., placenta). Se describen detalles adicionales relacionados con la fabricación, el uso y/o las ventajas de la matriz de crecimiento que se usó para reducir la presente invención a la práctica en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.168.085 y 5.266.476. En algunas realizaciones, la matriz tridimensional comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas. En otras realizaciones, las perlas son lisas o porosas.

25 Como se usa en el presente documento, un "recipiente" se refiere a cualquier tipo de receptáculo en el que se pueda contener material. En algunas realizaciones, el recipiente contiene líquido, tal como medio de cultivo. En algunas realizaciones adicionales, el recipiente tiene una entrada y una salida para introducir y sacar líquido del recipiente. En otras realizaciones, el material adherente está contenido en una cesta que está dentro del recipiente. En algunas realizaciones, la cesta está unida operativamente a un vibrador configurado para transmitir movimiento vibratorio a la cesta y su contenido.

35 Por ejemplo, para una matriz de crecimiento de 0,5 mm de altura, el aumento es en un factor de al menos 5 a 30 veces, calculado por proyección sobre una base de la matriz de crecimiento. Dicho aumento en un factor de aproximadamente 5 a 30 veces, es por capa unitaria y, si se usa una pluralidad de dichas capas, apiladas o separadas por espaciadores o similares, se aplica el factor de 5 a 30 veces por cada una de dichas estructuras. Cuando la matriz se usa en forma de lámina, esta puede ser láminas de fibra no tejidas o láminas de polímeros en espuma de poro abierto. El grosor de la lámina puede ser de aproximadamente 50 µm a 1000 µm, a 2000 µm a 3000 µm, o más, proporcionándose una porosidad adecuada para la entrada celular, entrada de nutrientes y para la eliminación de productos de desecho de la lámina. Según una realización, los poros tienen un diámetro efectivo de 10 µm a 400 µm. Dichas láminas se pueden preparar a partir de fibras de diversos grosores. En algunas realizaciones, el grosor de la fibra o el diámetro de la fibra varían de aproximadamente 0,5 µm a 100 µm. Por ejemplo, las fibras pueden estar en el intervalo de 10 µm a 15 µm de diámetro. Por ejemplo, las fibras pueden estar en el intervalo de 30 µm a 40 µm de diámetro. Por ejemplo, las fibras pueden estar en el intervalo de 70 µm a 80 µm de diámetro.

40 Las estructuras de la invención pueden estar soportadas por, o unidas a, una lámina o pantalla de soporte poroso que proporciona estabilidad dimensional y resistencia física. Dichas láminas de matriz también se pueden cortar, perforar o triturar para proporcionar partículas con un área proyectada del orden de aproximadamente 0,2 mm² a aproximadamente 30 mm², 0,2 mm² a aproximadamente 100 mm², 0,2 mm² a aproximadamente 200 mm², con el mismo orden de grosor (de aproximadamente 50 µm a 3000 µm).

45 La superficie adherente puede tener una forma seleccionada del grupo que consiste en cuadrados, anillos, discos y cruciformes. En algunas realizaciones, el cultivo se efectúa en un biorreactor 3D.

50 Los ejemplos de dichos biorreactores incluyen, pero sin limitación, un biorreactor de flujo de tapón, un biorreactor de tanque agitado continuo y un biorreactor de lecho estacionario. Por ejemplo, un biorreactor tridimensional (3D) de flujo de tapón (como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.911.201) es capaz de sostener el crecimiento y el mantenimiento prolongado de células estromales adherentes. En este biorreactor, se siembran células estromales adherentes en vehículos porosos hechos de una matriz de poliéster no tejida, empaquetada en una columna de vidrio,

permitiendo de este modo la propagación de grandes números de células en un volumen relativamente pequeño.

Se pueden usar otros biorreactores 3D con la presente invención. Otro ejemplo no limitante es un biorreactor de tanque agitado continuo, donde un medio de cultivo se introduce continuamente en el biorreactor y un producto se extrae continuamente, para mantener un estado estacionario constante a lo largo del tiempo dentro del reactor. Un biorreactor de tanque agitado con una cesta de lecho fibroso está disponible, por ejemplo, en New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ. Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de agitación por aire, [donde normalmente se introduce aire en el fondo de un tubo de aspiración central que fluye hacia arriba mientras se forman burbujas y se liberan gases de escape en la parte superior de la columna], un biorreactor de perfusión de siembra celular con espumas poliactivas [como se describe en Wendt, D. *et al.*, *Biotechnol Bioeng* 84: 205-214, (2003)] y armazones porosos tubulares de ácido poli-L-láctico (PLLA) en un biorreactor de perfusión de flujo radial [como se describe en Kitagawa *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 93(5): 947-954 (2006)]. Otros biorreactores que pueden usarse de acuerdo con la presente invención se describen en la patente de los Estados Unidos n.º 6.277.151, 6.197.575, 6.139.578, 6.132.463, 5.902.741 y 5.629.186. En otra realización, se puede utilizar una pluralidad de biorreactores en paralelo o en orientación en serie.

La matriz usada en el biorreactor puede, por ejemplo, estar en forma de lámina. Esta lámina puede ser una lámina de fibra no tejida o una lámina de polímeros en espuma de poro abierto. El grosor de la lámina es, en algunas realizaciones, de aproximadamente 50 µm a 3000 µm o más, proporcionándose una porosidad adecuada para la entrada celular, entrada de nutrientes y para la eliminación de productos de desecho de la lámina.

En algunas realizaciones, la siembra celular se realiza usando 1.000-10.000 células/cm² en la siembra.

El cultivo de las células adherentes en el cultivo 3D puede realizarse bajo un flujo continuo de un medio de cultivo. También se puede efectuar pase para aumentar el número de células. Se apreciará que el medio de cultivo puede cambiarse para prolongar y mejorar las condiciones de cultivo. Según una realización de la presente invención, el cultivo celular se efectúa en perfusión del medio de cultivo. Normalmente, la velocidad de perfusión está determinada por la concentración de glucosa en el medio de cultivo de las células adherentes. Por tanto, según las presentes enseñanzas, el medio de cultivo puede cambiarse cuando la concentración de glucosa es de aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 550 mg/l; o aproximadamente 600 mg/l. En otra realización, el medio de cultivo puede cambiarse cuando la concentración de glucosa está entre 200 y 1000 mg/l.

En algunas realizaciones, el cultivo de las células se efectúa durante al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 20 días, o más. Se apreciará que el cultivo en un biorreactor puede prolongar este periodo.

En otra realización, las células estromales adherentes del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 1.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones, las células estromales adherentes del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 5.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones más, las células estromales del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 10.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones más, las células estromales del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 20.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones más, las células estromales del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 30.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones más, las células estromales del cultivo de células estromales se cultivan hasta una densidad de al menos 40.000 células por centímetro cúbico del material adherente. En otras realizaciones, las células se cultivan hasta una densidad de 100.000 células por centímetro cúbico.

En otra realización, las células se cultivan durante un periodo de tiempo que facilita de 2 a 8 duplicaciones de la población celular.

En otra realización, las células se recogen según la densidad celular evaluada según la capacidad evaluada por supervisión de biomasa.

En otra realización, las células se recogen según la densidad celular evaluada según la tasa de consumo de glucosa (GCR).

Las células sembradas, cultivadas y/o recogidas por los métodos descritos en el presente documento pueden ser células estromales adherentes (ASC). Por tanto, por ejemplo, las células pueden tener forma de huso. Como alternativa o además las células pueden expresar un marcador o una colección de marcadores (p. ej., marcador de superficie) habituales para células estromales adherentes. Los ejemplos de marcadores de superficie de células estromales adherentes (positivos y negativos) incluyen, pero sin limitación, CD105+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD34-, CD45-, CD80-, CD19-, CD5-, CD20-, CD11B-, CD14-, CD19-, CD79-, HLA-DR- y FMC7-. Otros marcadores de células estromales adherentes incluyen, pero sin limitación, tirosina hidroxilasa, nestina y H-NF.

En determinadas realizaciones, se cultivan células estromales adherentes de médula ósea (MO) en un sistema de cultivo 3D y se recogen según los métodos desvelados en el presente documento. Pueden obtenerse células de MO

mediante cualquier procedimiento conocido. Por ejemplo, pueden obtenerse células de MO de médula del esternón aspirada de donantes hematológicamente sanos sometidos a cirugía a corazón abierto o biopsia de MO. Los aspirados de médula se diluyen tres veces en, por ejemplo, solución de sales equilibradas de Hank (HBSS; GIBCO BRL/Invitrogen, Gaithersburg MD) y se someten a centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA). A continuación, se recogen células mononucleares de médula ($<1,077 \text{ gm/cm}^3$), se lavan 3 veces en HBSS y se resuspenden en medio de cultivo [DMEM (Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel) complementado con FCS al 10 % (GIBCO BRL), mercaptoetanol 10^{-4} M (Merck, White House Station, NJ), mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml; Beit Ha'Emek), L-glutamina 2 mM (Beit Ha'Emek)]. Se incuban células de donantes individuales por separado en matraces de cultivo tisular (Corning, Acton, MA) a 37°C (CO_2 al 5 %) con cambio semanal de medios de cultivo. Las células se dividen cada 3-4 días usando tripsina-EDTA al 0,25 % (Beit Ha'Emek). Después de 2-40 pases, al alcanzar 60-80 % de confluencia, se recogen células para cultivo en un biorreactor 3D.

En otras realizaciones, se cultivan células obtenidas de la placenta en un sistema de cultivo 3D y se recogen según los métodos desvelados en el presente documento. Se pueden obtener células de placenta por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden obtenerse células de las partes internas de una placenta de parto a término. Las secciones adecuadas de la placenta se cortan en condiciones estériles, se lavan 3 veces con tampón de Hank y se incuban durante 3 h a 37°C con colagenasa al 0,1 % (1 mg/ml de tejido; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Usando pipeteo suave, las células suspendidas se lavan después con DMEM complementado con FCS al 10 %, mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM, se sembraron en matraces de 75 cm^2 y se incubaron a 37°C en una incubadora de cultivo tisular en condiciones humidificadas con CO_2 al 5 %. A continuación, se permite que las células se adhieran a una superficie de plástico durante 72 horas, después de lo cual se cambió el medio cada 3 - 4 días. Cuando se alcanza 60-80 % de confluencia (habitualmente 10-12 días), las células se desprenden del matraz de cultivo usando tripsina-EDTA al 0,25 % y se siembran en nuevos matraces. Se recogen células cultivadas para cultivo en un biorreactor 3D.

En otras realizaciones más, se cultivan células estromales adherentes obtenidas de tejido adiposo usando técnicas conocidas en este campo en un sistema de cultivo 3D y se recogen según los métodos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, pueden aislarse células estromales adherentes de tejido adiposo humano obtenido de procedimientos de liposucción. El tejido adiposo se lava abundantemente con volúmenes iguales de PBS y se digiere a 37°C durante 30 minutos con colagenasa (20 mg/ml). Después las células se lavan con DMEM que contiene FCS al 10 %, mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina y se centrifugan a 1200 rpm durante 10 min a TA, se resuspenden con solución de lisis (1:10; Biological Industries, Beit Ha'emek, Israel, para lisar glóbulos rojos) se centrifugan y se resuspenden con DMEM que contiene FCS al 10 %, mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina. Las células lavadas se siembran después en un matraz de medio de cultivo tisular estéril a $3-10 \times 10^7$ células/matraz. Al día siguiente, las células se lavan con PBS para eliminar glóbulos rojos residuales y células muertas. Las células se mantienen a 37°C en una incubadora de cultivo tisular en condiciones humidificadas con CO_2 al 5 %. El medio se cambia cada 3 a 4 días. A 60-80 % de confluencia, las células se desprenden del matraz de cultivo usando tripsina-EDTA al 0,25 % y se siembran en nuevos matraces. Después de 2-40 pases, cuando las células alcanzan 60-80 % de confluencia, se recogen para cultivar en un biorreactor 3D.

Cualquier sistema de biorreactor es adecuado para el cultivo en 3D de células adherentes de MO, placenta o adiposas descritas anteriormente. Por ejemplo, en una realización, se puede usar un biorreactor de flujo de tapón como se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.911.201. Este biorreactor puede cargarse, por ejemplo, con 1-100 ml de vehículos porosos 3D empaquetados (4 mm de diámetro) hechos de una matriz de tela no tejida de poliéster. Estos vehículos permiten la propagación de grandes números de células en un volumen relativamente pequeño. El biorreactor puede mantenerse en una incubadora de 37°C , con un caudal regulado y supervisado por una válvula y bomba peristáltica. El biorreactor puede contener un punto de muestreo e inyección que permita la siembra secuencial de células. Se puede suministrar medio de cultivo a cualquier pH adecuado, por ejemplo, pH 6,7-7,4, de un depósito. Se puede suministrar al depósito una mezcla de gases filtrados que contiene aire/ $\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{O}_2$ en diferentes proporciones dependiendo de la densidad celular en el biorreactor. La proporción de O_2 puede ajustarse para alcanzar el nivel deseado de O_2 disuelto a la salida del biorreactor, según lo determinado por un monitor. La mezcla de gases se puede suministrar al depósito a través de tubos de silicona o un difusor. Se puede realizar circulación del medio, por ejemplo, mediante una bomba peristáltica.

En una realización, cultivos 2D de células estromales adherentes humanas primarias no confluyentes (por ejemplo, las células de MO, placenta o adiposas descritas anteriormente), cultivados como se ha descrito anteriormente, se tripsinizan, se lavan, se resuspenden en DMEM complementado con FBS al 10 %, mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml) y L-glutamina 2 mM y se siembran (10^3-10^5 células/ml) a través del punto de inyección en los vehículos 3D en un biorreactor de flujo de tapón estéril. Antes de la inoculación, el biorreactor se carga con un tampón adecuado, tal como PBS-Ca-Mg, se esteriliza por autoclave (120°C , 30 min) y se lava con medio de cultivo de Dulbecco que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % y una mezcla Pen-Strep-Nistatina (100 U/ml:100 ug/ml:1,25 un/ml). El flujo del medio dentro del biorreactor puede ajustarse a cualquier velocidad adecuada, por ejemplo, una velocidad de 0,1-5 ml/min. El proceso de siembra de células en la matriz se puede realizar, por ejemplo, deteniendo la circulación del medio durante 2-48 horas para permitir que las células se sedimenten en los vehículos. El biorreactor se mantiene a una temperatura controlada (37°C) y condiciones de pH (pH = 6,7-7,8);

usando una incubadora con aire estéril y CO₂ según sea necesario. El medio de cultivo se reemplaza según sea necesario, por ejemplo, 2-3 veces a la semana. El medio de circulación se reemplaza con medio DMEM nuevo, cada 4 horas a 7 días. Una vez que las células han crecido hasta una concentración adecuada, pueden recogerse según los métodos descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un "vibrador" significa cualquier dispositivo que sea capaz de provocar vibración. "Vibración" significa oscilaciones mecánicas alrededor de un punto de equilibrio. Las oscilaciones pueden ser periódicas o aleatorias. En una realización, la vibración se debe a oscilaciones lineales recíprocas que se controlan con respecto a la amplitud y frecuencia. En algunas realizaciones, la amplitud y frecuencia de las oscilaciones son constantes, mientras que en otras realizaciones una o ambas de la amplitud o frecuencia pueden variarse según se desee para lograr un resultado particular. En otras realizaciones más, la duración del periodo de tiempo para las vibraciones también se controla usando medios y dispositivos que son convencionales en la técnica. En algunas realizaciones, el vibrador es un dispositivo electromecánico, por ejemplo, un motor eléctrico con una masa desequilibrada en su eje de transmisión. En otras realizaciones, el vibrador es un dispositivo eléctrico. Se conocen en la técnica dispositivos capaces de transmitir vibraciones y está dentro de la experiencia en la técnica adaptar vibradores existentes de una manera adecuada para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Pluristem desarrolló un sistema de recogida por vibración. Esta realización particular del sistema de recogida por vibración se diseñó para un biorreactor de 5 litros (New Brunswick Scientific) y está compuesta por un sistema de vibración (como se muestra en las figuras 9A-D) y una cesta de nuevo diseño (como se muestra en la figura 6) que contendrá 100 g de Fibracel®. En esta realización, y en referencia a la figura 6, la cesta incluye una pared ubicada perpendicularmente a una pantalla superior y una pantalla inferior, teniendo cada pantalla perforaciones en las mismas. La matriz 3D está contenida dentro del espacio formado rodeado por la pared y las pantallas superior e inferior. Una o ambas pantallas pueden configurarse de modo que puedan retirarse de la cesta para permitir el acceso al espacio que contiene la matriz 3D. La cesta también incluye un sello de cesta para proporcionar un sello entre el perímetro de la cesta y la superficie interna del recipiente o envase del biorreactor. Como se muestra en la figura 4A y 4B, la cesta puede contener uno o más conductos, bien ubicados en el centro o distantes, en que componentes del biorreactor, por ejemplo, un tubo de drenaje o impulsor, puede estar ubicados.

Unidas a la cesta hay una pluralidad de barras de cesta que se extienden desde la cesta hasta el exterior del recipiente o envase del biorreactor a través del cual se realiza una conexión funcional con el vibrador. En esta realización, el recipiente está cerrado herméticamente con una placa que tiene agujeros a través de los cuales pasan las barras de la cesta. En el exterior de la placa, cada barra de la cesta pasa a través de un fuelle configurado para acomodar el movimiento oscilante transmitido por el vibrador y para proporcionar un cierre hermético que evita que entren contaminantes en el recipiente o envase.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", y "que tiene", significan incluyendo, pero sin limitación.

La expresión "que consiste en" significa que incluye y limitado a.

Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

Ejemplos

A continuación, se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran la invención de manera no limitante.

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory 30 Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de los Estados Unidos

n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente en la bibliografía de patentes y científica inmunoensayos disponibles, véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and 10 Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for 15 Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

15 Procedimiento de crecimiento de cultivo celular en biorreactor 3D:

Las células se cultivaron en cultivo 3D usando un sistema de biorreactor RALF. El biorreactor RALF es un recipiente de vidrio de doble camisa, de fondo redondo, con un volumen total de 3,7 litros fabricado por BioEngineering.

20 Antes de sembrar en el biorreactor, se descongelaron $180 \pm 30 \times 10^6$ células de la etapa 2D y se diluyeron 1:3 con medio (DMEM con FBS al 10 % y HEPES 25 mM). Se tomó una muestra y se contaron las células usando una tinción con azul de tripano para determinar el número y la viabilidad de células. La suspensión celular se transfirió bajo una campana de flujo laminar a un frasco de siembra de 0,5 l. Del frasco de siembra, la suspensión celular se transfirió por gravedad a través de tubos estériles al biorreactor.

25 El biorreactor contenía $1,8 \pm 0,1$ l de medio (DMEM con FBS al 10 % y HEPES 25 mM) y 30-40 gramos de vehículos (discos FibraCel®, New Brunswick Scientific). Estos vehículos están hechos de poliéster y polipropileno. El medio en el biorreactor se mantuvo en las siguientes condiciones: 37 °C, oxígeno disuelto ("OD") al 70 % y pH 7,3. Se suministraron gases filtrados (aire, CO₂, N₂ y O₂) según lo determinado por el sistema de control del biorreactor para mantener el valor de OD al 70 % y el valor de pH a 7,3. El medio circula en el biorreactor por medio de un tubo impulsor hueco con orificios de descarga situados sobre la cesta que sostiene los vehículos. Como con el impulsor Cell-lift, la rotación de estos orificios de descarga crea una presión diferencial baja en la base del tubo impulsor, que hace circular los medios por todo el sistema.

35 Durante las primeras 4 horas, El medio se agitó a 50 revoluciones por minuto (RPM) y se aumentó hasta 200 RPM el día 2. Durante los primeros 2-3 días, las células se cultivaron en modo discontinuo. Se inició la perfusión cuando la concentración glucosa en el medio se redujo a menos de 550 mg/litro. La perfusión se ajustó diariamente para mantener la concentración de glucosa constante a aproximadamente 550 ± 50 mg/litro. Se tomó una muestra del medio de cultivo cada 1-2 días para determinación de la concentración de glucosa, lactato, glutamina, glutamato y amonio (analizador BioProfile 400, Nova Biomedical). Las células se cultivaron en los biorreactores durante 6-7 días.

Recogida de los vehículos 3D usando un impulsor de tipo marino (agitación):

45 El proceso de recogida de células comenzó al final de la fase de crecimiento (6-7 días). El recipiente de biorreactor se vació por gravedad a través de tubos a un depósito de residuos. El recipiente se abrió quitando la placa superior y los vehículos se transfirieron al fondo del recipiente. El impulsor Cell-lift se reemplazó con un impulsor estéril de tipo marino. El impulsor de tipo marino produce un flujo axial para aplicaciones que requieren mezcla suave sin provocar daños a las células debido al flujo unidireccional.

50 Después el recipiente del biorreactor se cerró y se rellenó con 1 litro de PBS precalentado (37 °C). La velocidad de agitación se ajustó a 200 RPM durante 2 minutos. Después el PBS se drenó a través de tubos por presión o gravedad al frasco de residuos. El procedimiento de lavado se repitió tres veces.

55 Para liberar las células de los vehículos, se añadió 1 litro de solución de tripsina recombinante precalentada (37 °C) (TrypLE; GIBCO) al recipiente del biorreactor y los vehículos se incubaron durante 15 minutos. Durante esta incubación, los vehículos se agitaron durante 1 minuto a 200 RPM cada 5 minutos. La suspensión celular se recogió después en un recipiente estéril de 2 litros que contenía 200 ml de FBS. Esta etapa se repitió con TrypLE precalentado (37 °C) durante 10 minutos (los vehículos se agitaron durante 1 minuto a 200 RPM cada 4 minutos). Para lavar las células desprendidas de los vehículos, se añadió 1 litro de medio al recipiente del biorreactor y los vehículos se agitaron a 200 RPM durante 2 minutos.

La suspensión celular de las tres etapas se combinó y después se dividió en tubos de centrifuga estériles de 500 ml. Las células se concentraron por centrifugación y se contaron.

65 Recogida de los vehículos 3D usando el prototipo del sistema de recogida (vibración):

El proceso de recogida de células comenzó al final de la fase de crecimiento (6-7 días). El recipiente de biorreactor se vació por gravedad a través de tubos a un depósito de residuos. El recipiente se abrió quitando la placa superior, se abrió la cesta que contenía los vehículos y se transfirieron los vehículos 3D, usando pinzas estériles, de la cesta a un vaso de precipitados de vidrio estéril. Los vehículos se lavaron 2-3 veces con 1 litro de PBS precalentado (37 °C). Los vehículos lavados se transfirieron a la cesta del sistema de recogida (prototipo) y la cesta que contenía los vehículos lavados se colocó en un recipiente de 2,2 litros que contenía 1,8 litros de TrypLE precalentado (37 °C). Durante esta incubación en TrypLE (1-32 min), la cesta se hizo vibrar a baja frecuencia (0,7 Hz) para garantizar la mezcla uniforme de la solución de tripsina por toda la cesta. Para liberar las células de los vehículos (etapa de recogida), la cesta se hizo vibrar durante 1 minuto cada 3-8 minutos, usando una amplitud de 12 mm o 25 mm y una frecuencia de 3 Hz o 6 Hz, como se ha especificado. Durante la etapa de recogida, se recogieron muestras de 5 ml de suspensión celular, en diferentes puntos temporales, en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 1 ml de FBS. La suspensión celular se centrifugó, el sedimento celular se suspendió en 1 ml de medio y se contó o la suspensión celular total se dividió en tubos de centrifuga estériles de 500 ml, las células se centrifugaron, se resuspendieron y se contaron.

15 Crioconservación de muestras celulares:

Las células se crioconservaron a una concentración de 10x10⁶ células/ml en solución de congelación 3D (PlasmaLyte, Baxter) con DMSO al 10 % (Wak-Chemie, GMBH) y albúmina de suero humano al 5 % (Biotest Pharma, GMBH)] para evaluación de la viabilidad y la vitalidad después de descongelar.

20 Número de células:

El número de células después de la recogida se midió por el método de exclusión de azul de tripano, usando los instrumentos Cedex (Roche Applied Science - Innovatis) o Countess (Life Technologies - Invitrogen).

25 Viabilidad:

La viabilidad se midió por el método de exclusión de azul de tripano, usando el instrumento Cedex o el hemocitómetro. Eficacia de recogida:

30 Se evaluó el número de células unidas a los vehículos FibraCel, antes y después de la recogida, usando la D.O. del ensayo de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La eficacia de recogida se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Valor de DO antes de la recogida} - \text{valor de DO después de la recogida}}{\text{Valor de DO antes de la recogida}} \times 100$$

35 El valor representa el porcentaje de celdas retiradas de los vehículos después de la recogida (valor alto = alta eficacia de recogida y viceversa).

40 Vitalidad:

Las células se descongelaron, se sembraron en pocillos de placas de 24 pocillos (10.000 células/pocillo/ml) y se cultivaron durante 1 y 4 días. Se evaluó la vitalidad posterior a la descongelación usando la D.O. del ensayo MTT. Cada muestra se sometió a ensayo por triplicado.

45 Resultados experimentales:

Ejemplo 1:

50 Al final de la fase de crecimiento, los vehículos se lavaron como se ha descrito anteriormente y se transfirieron a la cesta del sistema de recogida. Los vehículos se incubaron en TrypLE durante 32 minutos haciendo vibrar al mismo tiempo la cesta a baja frecuencia (0,7 Hz). Cada 3 minutos, la cesta se hizo vibrar durante 1 minuto a una frecuencia (Hz) y amplitud (mm) diferentes, como se especifica en la tabla 1. En cada punto temporal, se recogió una muestra de 5 ml de suspensión celular en un tubo de centrifuga de 50 ml y se contó el número de células usando el instrumento Cedex.

55 Tabla 1: Parámetros del sistema de recogida

Tiempo (minutos)	4	8	12	16	20	24	28	32
Tensión (voltios)	24	24	31,1	7,1	13,4	14,2	14,2	14,2
Frecuencia (Hz)	6	6	7,8	1,8	3,4	3,6	3,6	3,6
Amplitud (mm)	12	12	12	25	25	25	25	25
Posición de la cesta	alta	alta	alta	alta	baja	baja	baja	baja

El efecto de los parámetros de recogida (tiempo, frecuencia y amplitud) en la concentración celular en los líquidos de recogida se muestra en la figura 10. Aunque la amplitud se modificó durante el periodo de incubación (después de 16 minutos), los resultados muestran que el uso de una amplitud de 25 mm, en comparación con 12 mm, fue más eficaz en la recogida de las células.

5

Ejemplo 2:

Al final de la fase de crecimiento (6 días) los vehículos se lavaron y transfirieron a la cesta del sistema de recogida. Los vehículos se incubaron en TrypLE durante 20 minutos mientras se movía la cesta a amplitud de 25 mm y baja frecuencia (0,7 Hz). Cada 4 minutos, la cesta se hizo vibrar durante 1 minuto a una amplitud de 25 mm y una frecuencia de 6 Hz. En cada punto temporal, se recogió una muestra de 5 ml de suspensión celular en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 1 ml de FBS. La suspensión celular se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 ml de medio (DMEM con FBS al 10 % y HEPES 25 mM) y se contaron usando el instrumento Cedex.

10

15

El efecto del tiempo de recogida sobre el número de células en la muestra de 5 ml se muestra en la figura 11. Se puede ver que cuando el sistema de recogida funcionaba en una amplitud de 25 mm y una frecuencia de 6 Hz, el número de células contadas en la solución después de 5 minutos no aumentaba con el tiempo.

20

En otro experimento, se tomaron muestras de los vehículos al final de la fase de crecimiento (antes de la recogida) y al final del procedimiento de recogida usando el prototipo del sistema de recogida (amplitud de 25 mm, frecuencia de 6 Hz, duración de 20 minutos). El número de células unidas a los vehículos FibraCel se evaluó usando el ensayo MTT. El valor de eficacia de recogida representa el porcentaje de células eliminadas de los vehículos al final del procedimiento de recogida en función de los resultados de D.O. del ensayo MTT.

25

Los resultados del ensayo MTT de vehículos antes y después del procedimiento de recogida (figura 12) muestran que la eficacia de recogida fue del 98 %.

Ejemplo 3:

30

Al final de la fase de crecimiento (7 días), los vehículos se lavaron y se transfirieron a la cesta del sistema de recogida. Los vehículos se incubaron en TrypLE durante 8 minutos mientras se agitaba la cesta a amplitud de 25 mm a baja frecuencia (0,7 Hz). Después de 8 minutos de incubación, la cesta se agitó durante 1 minuto a una amplitud de 25 mm en una frecuencia de 3 Hz o 6 Hz, como se ha especificado. En cada punto temporal, se recogió una muestra de 5 ml de suspensión celular en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 1 ml de FBS. La suspensión celular se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 ml de medio y se contaron usando el instrumento Countess.

35

El efecto de la frecuencia y el tiempo de recogida sobre el número de células en una muestra de 5 ml se muestra en la figura 13. Se descubrió que durante 1 min en amplitud de 25 mm, la frecuencia de 6 Hz fue más eficaz en la recogida que la frecuencia de 3 Hz.

40

En otro experimento, se tomaron muestras de los vehículos al final de la fase de crecimiento (antes de la recogida) y al final del procedimiento de recogida. El número de células unidas a los vehículos FibraCel antes de la recogida y después de la recogida usando frecuencias de 3 Hz o 6 Hz se evaluó usando el ensayo MTT como se muestra en la figura 14. El valor de eficacia de recogida representa el porcentaje de células retiradas de los vehículos después de la recogida, usando frecuencias de 3 Hz o 6 Hz, en función de los resultados de DO del ensayo MTT. En correlación con el número de células, mostrado en la figura 13, se puede observar que la eficacia de recogida con frecuencia de 6 Hz (amplitud de 25 mm, 1 min) fue mayor que con frecuencia de 3 Hz.

45

50

Se tomaron muestras de células de cada grupo (frecuencia de 6 Hz o 3 Hz) en cada punto temporal y se crioconservaron. Las células se descongelaron, se sembraron con una concentración de 10.000 células/ml/pocillo en placas de 24 pocillos. Las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 4 días. La vitalidad después de la descongelación de las células se evaluó usando la D.O. del ensayo MTT (figura 15).

55

Según la vitalidad después de descongelación de las células, la frecuencia mayor (6 Hz) aplicada durante un minuto no dañó las células más que la baja frecuencia de 3 Hz.

Ejemplo 4:

60

Al final de la fase de crecimiento (7 días), las células de cada sistema de biorreactor se recogieron por agitación, usando un impulsor de tipo marino, o por vibración (incubación de 8 minutos en TrypLE, 0,7 Hz en una amplitud de 25 mm, seguido de una vibración de 1 minuto a 6 Hz en una amplitud de 25 mm). La suspensión celular de cada procedimiento de recogida se dividió en tubos de centrifuga estériles de 500 ml, las células se centrifugaron y se resuspendieron y se contaron los números totales de células usando el instrumento Countess. Como se muestra en la siguiente tabla, el procedimiento de vibración de la invención liberó más células de la matriz en comparación con el uso de un impulsor para agitar los vehículos.

65

	Método de recogida	
	Agitación	Vibración
Número total de células	421x10 ⁶	1.045x10 ⁶

5 En otro experimento, se tomaron muestras de los vehículos de cada sistema de biorreactor al final de la fase de crecimiento (antes de la recogida) y al final del procedimiento de recogida de agitación o vibración. El número de células unidas a los vehículos FibraCel se evaluó usando la D.O. del ensayo MTT. El valor de eficacia de recogida representa el porcentaje de células retiradas de los vehículos después de la recogida por agitación o vibración en función de los resultados de O.D. del ensayo MTT (figura 16). La eficacia de recogida fue mayor usando el sistema de vibración (87 %) que la eficacia de recogida usando el método de agitación (14 %).

10 Las células recogidas por cada uno de los métodos (agitación o vibración) se crioconservaron. Las células se descongelaron y se evaluó la viabilidad de las células después de la descongelación con el método de exclusión de colorante azul de tripano usando el hemocitómetro. En la figura 17 se muestra el efecto del método de recogida sobre la viabilidad después de la descongelación de las células. La viabilidad después la descongelación de las células fue alta usando ambos métodos de recogida.

15 Se crioconservaron células recogidas por cada uno de los métodos (agitación o vibración). Las células se descongelaron, se sembraron con concentración de 10.000 células/ml/pocillo en una placa de 24 pocillos. Las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 1 o 4 días. La vitalidad después de la descongelación de las células se evaluó en función de la D.O. del ensayo MTT. Cada muestra se sometió a ensayo por triplicado.

20 En la figura 18 se muestra el efecto del método de recogida sobre la vitalidad después de la descongelación de las células. Se puede ver que no se encontró ninguna diferencia en la vitalidad después de la descongelación de las células, recogidas usando ambos métodos, el primer día, mientras que la vitalidad después de la descongelación de las células recogidas usando el sistema de vibración fue ligeramente menor el día 4 en comparación con las células recogidas aplicando el método de agitación.

Ejemplo 5:

30 Se usó un método de colorante para evaluar el tiempo de circulación y mezcla del fluido dentro del lecho vibratorio empaquetado con matriz 3D. La eficacia de circulación transmitida por la vibración se evaluó según las mediciones de los dos parámetros siguientes:

35 Tiempo de circulación: El periodo de tiempo entre el inicio de la vibración hasta que el colorante rojo introducido en el centro del lecho empaquetado se observa fuera del lecho empaquetado.

Tiempo de mezcla: El periodo de tiempo entre el inicio de la vibración hasta que el colorante rojo se distribuye uniformemente por todo el recipiente del biorreactor.

Procedimiento:

40 La realización de biorreactor del sistema de recogida por vibración desarrollada por Pluristem en cooperación con ARAN Research & Development (véase figuras 6 y 9A-D) se llenó con 3,6 l de agua con doble destilación. Se inyectó un ml de colorante rojo Duracet Luminous usando un dispositivo de inyección en el centro de la cesta en dos sitios diferentes, 0,5 ml de colorante en cada sitio.

45 Se midieron los tiempos de circulación y mezcla mientras se hacía vibrar la cesta a una amplitud de 25 mm usando frecuencias de 1, 2 o 3 Hz. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Frecuencia (Hz)	Tiempo de circulación (s)	Tiempo de mezcla (s)
1	8	70
2	4	55
3	3,5	30

50 El tiempo de circulación del lecho empaquetado y el tiempo de mezcla que se midieron mediante inspección visual del colorante indican que el movimiento de vibración generará circulación de líquido dentro y fuera de la cesta del biorreactor. El tiempo de circulación del lecho empaquetado y los tiempos de mezcla son suficientes para tener un flujo uniforme dentro de la cesta y en el recipiente para permitir la siembra y el cultivo de células de manera uniforme sin usar un impulsor para generar suspensiones celulares y hacer circular el medio.

55 Ejemplo 6:

En este experimento, se probó un sistema de recogida de 5 l para determinar el crecimiento celular y la eficacia de recogida. Los parámetros de recogida que se evaluaron fueron: la frecuencia de vibración y la duración de la vibración

(usando una amplitud de 25 mm). Durante todo el proceso de recogida, se supervisó la biomasa en línea y se realizó un muestreo de la suspensión celular para recuentos celulares en puntos determinados.

5 Los valores de capacidad, que se correlacionan con el número de células viables, se midieron para supervisar el rendimiento de la recogida usando un monitor de biomasa de Aber Instruments.

10 Los valores de capacidad en función de la frecuencia de vibración se muestran en la figura 19. Como se ve en la figura, se ha demostrado una correlación entre la frecuencia de vibración y la eficacia de recogida, según lo medido por los valores de capacidad de la suspensión. La mayor eficacia de recogida se obtuvo a frecuencia de 5 Hz, que es la frecuencia técnica máxima del sistema.

Se evaluó el número de células unidas a los vehículos de disco FibraCel, antes y después de la recogida, usando el ensayo MTT como se ha descrito previamente. La eficacia de recogida se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Valor de DO antes de la recogida} - \text{valor de DO después de la recogida}}{\text{Valor de DO antes de la recogida}} \times 100$$

15 El valor representa el porcentaje de células retiradas de los vehículos después de la recogida (un valor alto = una alta eficacia de recogida y viceversa). Se tomaron muestras de vehículos después de la recogida desde diferentes profundidades en la cesta para evaluar la eficacia y la uniformidad de la recogida. Los resultados del ensayo MTT del vehículo (O.D.) y la eficacia de recogida (%) en diferentes profundidades de la cesta se presentan en la siguiente tabla:

20

	Antes de la recogida	Después de la recogida de la parte superior	Después de la recogida de la parte media	Después de la recogida de la parte inferior
D.O. promedio	0,557	0,048	0,080	0,096
DT	0,161	0,010	0,030	0,079
Eficacia de recogida (%)	ND	97,6	91,5	88,4

25 Las eficacias de recogida en la parte superior, la parte media y la parte inferior de la cesta fueron de 97,6 %, 91,5 % y 88,4 %, respectivamente (véase figura 20). Esto indica que el uso de vibración proporciona un procedimiento de recogida eficaz y uniforme en toda la cesta en las condiciones de recogida especificadas.

30 Se compararon los resultados del ensayo MTT de vehículos (D.O.) y las eficiencias de recogida para las cestas diseñadas (recogida por vibración) y originales (recogida por agitación) para evaluar el rendimiento de la recogida. La cesta "original" es un producto disponible para la venta que incluye dos pantallas metálicas perforadas en posición horizontal, que se extienden hasta las paredes internas del recipiente del biorreactor (como se muestra en la figura 4A). Contenido entre esas pantallas, un lecho de discos FibraCel® actúa como matriz de soporte sólido para el crecimiento celular. La cesta "diseñada" desarrollada por Pluristem es una mejora con respecto a la cesta original, porque debido a las dimensiones de la cesta esta no está en contacto con la pared interior del recipiente de vidrio, lo que facilita su movimiento oscilante. Además, como se muestra en la figura 6, la cesta diseñada incluye un cierre hermético de cesta que evita que el medio fluya entre el biorreactor y las paredes de la cesta.

35 Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	Diseñado antes de la recogida	Diseñado después de la recogida*	Original antes de la recogida	Original después de la recogida
D.O. promedio	0,557	0,075	0,568	0,101
DT	0,161	0,052	0,108	0,022
Eficacia de recogida (%)	92,5		88,9	

* Los datos presentan valores promedio de vehículos de muestras tomadas de diferentes profundidades de la cesta

40 Las eficacias de recogida de agitación totales fueron de 92,5 % para la cesta diseñada en comparación con 88,9 % de la cesta original (véase figura 21).

45 En otro experimento, se usaron una amplitud de 25 mm y una frecuencia de 5 Hz para probar el efecto de la duración de la vibración sobre la eficacia de recogida y la calidad celular. El efecto del tiempo de incubación antes de aplicar la fuerza de vibración se examinó aplicando vibración suave usando una amplitud de 25 mm y una frecuencia de 1 Hz para permitir la mezcla eficaz de las soluciones (DPBS y TrypLE).

Durante todo el proceso de recogida, se aplicó supervisión de biomasa en línea y se tomaron muestras de suspensiones celulares para recuentos celulares en determinados puntos. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Etapa de recogida	Capacidad (pF/cm ²)	Concentración celular (célulasx10 ⁶ /ml)	Viabilidad (%)
Primer lavado (DPBS)	0,7	NP	NP
Segundo lavado (DPBS)	0,0	NP	NP
Preincubación (TrypLE)	1,0	0,131	95
Incubación de 8 min (TrypLE)	1,5	0,208	84,3
Vibración de 30 segundos (5 Hz)	3,7	0,775	95
Vibración de 60 segundos (5 Hz)	5,1	0,825	92,5
Vibración de 90 segundos (5 Hz)	5,5	0,75	89,5
Vibración de 120 segundos (5 Hz)	5,6	0,766	91,6
Lavar con DPBS	1,6	0,238	88
Segundo tratamiento con TrypLE	0,6	NP	NP

5 Se muestran valores de capacidad en función de la duración de la vibración a una frecuencia de 5 Hz en la figura 22.

La concentración y viabilidad celular se determinaron usando el Countess al final de cada etapa. Se presentan concentraciones celulares en función de la duración de la vibración a una frecuencia de 5 Hz en la figura 23.

10 El proceso de recogida (a una frecuencia de 5 Hz) fue muy eficaz en los primeros 30 segundos, según lo medido por la concentración celular, y dentro de los primeros 60 segundos medido por los valores de capacidad de la suspensión. La continuación de la vibración durante un tiempo adicional no tuvo mucho efecto en los rendimientos celulares según los valores de concentración y capacidad celular.

15 Además, la extensión de la duración de la vibración hasta 120 segundos no tuvo una influencia significativa en la viabilidad celular, que estuvo por encima del 84 % en todos los casos.

20 Los resultados del ensayo MTT del vehículo (D.O.) y eficacias de recogida (%) en diferentes profundidades de la cesta se presentan en la siguiente tabla:

	Antes de la recogida	Después de la recogida de la parte superior	Después de la recogida de la parte media	Después de la recogida de la parte inferior	Después de la recogida promedio*
D.O. promedio	1,059	0,081	0,206	0,064	0,117
DT	0,266	0,057	0,147	0,065	0,115
Eficacia de recogida (%)	ND	92,4	80,6	94,0	89,0

* Los datos presentan valores promedio de vehículos de muestras tomadas de diferentes profundidades de la cesta

25 La eficacia de recogida en la parte superior, la parte media y la parte inferior de la cesta fueron de 92,4 %, 80,6 % y 94,0 %, respectivamente (véase figura 24), lo que indica un procedimiento de recogida eficaz (>80 %) en toda la cesta en las condiciones de recogida especificadas. La eficacia total de recogida fue del 89 %, que es mayor que la eficacia del método de recogida de agitación usado en la actualidad.

30 También se sembraron células a una concentración de 30.000 células/ml/pocillo en una placa de 24 pocillos para pruebas de vitalidad. Las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 24 horas. La prueba de vitalidad se basó en el ensayo MTT, con cada muestra probada por triplicado.

El efecto de la duración de la vibración sobre la vitalidad de células (nuevas) se presenta en la siguiente tabla:

	Preincubación	0 s	30 s	60 s	90 s	120 s
D.O. de MTT promedio	0,147	0,195	0,216	0,192	0,206	0,181
DT	0,016	0,014	0,003	0,009	0,008	0,013

35 Los datos también se muestran en la figura 25. Los resultados de la prueba de vitalidad no demuestran ningún efecto significativo de la duración de la vibración (hasta 120 segundos) sobre la vitalidad de las células. Estos resultados demuestran la eficacia de la capacidad del sistema de recogida de vibraciones con respecto a rendimiento celular, uniformidad de recogida y calidad celular.

Ejemplo 6:

Este experimento demuestra la eficacia del método de recogida de vibraciones en la recuperación de células cultivadas en diferentes matrices 3D.

Para probar la utilidad del método de recogida basado en vibraciones con diferentes tipos de matrices 3D, las ASC procedentes de placenta humana se sembraron en tres tipos de matrices 3D adherentes: una esponja de gelatina porosa, una matriz de fibra tejida de 34 µm y una matriz de fibra tejida de 70 µm. Después de la siembra y un periodo de crecimiento celular (3 o 5 días), se recogieron células de las matrices por vibración. El ensayo MTT, la tinción celular y los recuentos celulares se usaron para determinar la eficacia de recogida.

La esponja de gelatina porosa 3D usada en este ejemplo fue la esponja Spongostan® (Ethicon, NJ). La esponja se cortó en trozos de 3 cm x 1 cm en una campana biológica. Se hidrataron diez trozos de la esponja en 45 ml de Medio Esencial Mínimo de Dulbecco ("DMEM") complementado con L-glutamina 2 mM, FBS al 10 % y gentamicina 50 mg/ml ("DMEM completo") en un recipiente de 50 ml (dos recipientes en total) durante una noche.

La esponja hidratada se colocó en una placa de seis pocillos, habiéndose eliminado exceso de líquido de las esponjas. Para sembrar las esponjas, se descongelaron 1×10^7 ASC y la concentración celular se ajustó a 2×10^6 células/ml. Cada esponja se sembró con 100 µl de suspensión celular (200.000 células). Las esponjas se colocaron en una incubadora (37 °C, CO₂ al 5 %) durante 45 minutos y la suspensión celular se mantuvo en hielo. Después de los 45 minutos, las esponjas se dieron la vuelta y se sembraron 100 µl adicionales (200.000 células) en cada esponja. Esto se siguió de otra incubación de 45 minutos. Después de esta segunda incubación, se colocaron dos esponjas cada una en tubos de 50 ml (5 tubos en total) con 20 ml de DMEM completo. Las tapas de los tubos se dejaron ligeramente abiertas para intercambio de gases y los tubos se incubaron (37 °C, CO₂ al 5 %) durante cinco días para permitir el crecimiento celular.

La matriz de fibra tejida de 34 µm (PETEX; pantallas tejidas de precisión de poliéster, diámetro de fibra 34 µm, SEFAR, Suiza) y la matriz de fibra tejida de 70 µm (PES; poliéster, diámetro de fibra 70 µm, SAATI, Italia) se cortaron cada una en trozos de 1 x 0,5 cm. Los trozos cortados de la matriz se distribuyeron en una cesta de matraz giratorio y se esterilizaron por autoclave. A continuación, se añadieron 150 ml de DMEM completo a cada matraz giratorio y las matrices se hidrataron durante una noche.

Para sembrar las matrices de fibra PETEX y PES, el DMEM se reemplazó con 150 ml de DMEM completo nuevo. A cada matraz giratorio se añadieron $1,4 \times 10^7$ ASC y los matraces giratorios se colocaron en una incubadora (37 °C, CO₂ al 5 %) durante cuatro horas girando los giratorios a una velocidad de 40 RPM. Después de cuatro horas, la velocidad de rotación se elevó a 120 RPM y se permitió que las ASC crecieran durante cinco días.

Las ASC cultivadas en los vehículos se recogieron por vibración de la siguiente manera. Los matraces giratorios y los tubos de 50 ml se retiraron de la incubadora. Se usaron diez vehículos tejidos de cada tamaño (34 µm y 70 µm) para tinción celular y evaluación usando el ensayo MTT. De manera similar, se usaron dos vehículos de esponja (cada esponja cortada en tres trozos) para tinción celular y el ensayo MTT.

Los medios de cultivo se descartaron y las esponjas de gel se lavaron dos veces con PBS. Las esponjas se cortaron por la mitad y se colocaron en un lecho empaquetado de matraz rotatorio y el lecho empaquetado se colocó en un recipiente cargado con 800 ml de TrypLE precalentado (37 °C). Después las esponjas se hicieron vibrar inmediatamente durante 5 segundos a 5 Hz, 5 minutos a 1 Hz y 30 segundos a 5 Hz (todo con una amplitud de 25 mm). Después de la vibración, se añadieron 200 ml de FBS y el medio se transfirió a dos tubos de centrifuga de 500 ml. Las células se centrifugaron a 1.200 RPM durante 10 minutos a 4 °C, el sedimento celular se resuspendió y se realizaron recuentos celulares. Los dos tipos de vehículos tejidos se procesaron de manera similar y las células se recogieron de esos vehículos usando las mismas condiciones de vibración.

Además, las matrices se tiñeron antes y después de la recogida de células con tinción nuclear Hoechst 33258 y las células se visualizaron mediante microscopia fluorescente. Mediante esta visualización directa (resultados no mostrados), se mostró que el método de recogida de vibraciones elimina de manera eficaz la mayoría de células viables de los diferentes tipos de matrices 3D probadas. Estos resultados fueron confirmados por los valores de D.O. del ensayo MTT.

Resultados de MTT

	Promedio Lectura de DO (fondo restado)	Desviación típica	Porcentaje de eliminación celular
Tejido de 70 micrómetros AV	0,152375	0,032754	
Tejido en 70 micrómetros DV	0,012875	0,013569	91 %

(continuación)

	Promedio Lectura de DO (fondo restado)	Desviación típica	Porcentaje de eliminación celular
Tejido de 35 micrómetros AV	0,08725	0,025949	
Tejido de 35 micrómetros DV	0,00125	0,004062	98 %
Esponja de gelatina AV	0,305	0,088019	
Esponja de gelatina DV	0,091625	0,018419	69 %

AV - antes de la vibración
DV - después de la vibración

5 La vibración de matrices 3D dio como resultado altos porcentajes de eliminación de células, mayor del 90 % para las matrices 3D tejidas y 69 % para la esponja de gelatina porosa. En este experimento, no se realizó ningún intento de optimizar las características de vibración para maximizar la recuperación celular de estas matrices específicas, de modo que sea posible obtener eficacias de recuperación celular aún mayores.

Los resultados de recuento y viabilidad celular se presentan en la siguiente tabla:

10 Resultados de recuento y viabilidad celular

	Células eliminadas	Viabilidad (azul de tripano)
Tejido 70 micrómetros	2,18E+07	87 %
Tejido 35 micrómetros	1,70E+07	85 %
Esponja de gelatina	6,20E+06	88 %

Según estos datos, el método de recogida de células basado en vibración es eficaz para eliminar células de cada una de las matrices 3D probadas, manteniendo al mismo tiempo un alto grado de viabilidad celular.

15 Estos resultados demuestran que el método de recogida de células por vibración es muy eficaz con una amplia gama de tipos de armazones 3D.

20 Se apreciará que determinadas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

25 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, resulta evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones estarán claras para los expertos en la materia. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debería interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para recoger células que han crecido en cultivo, que comprende:

- 5 a) cultivar las células en un material adherente, en donde las células se unen al material adherente y el material adherente se mantiene en una cesta que está dentro de un recipiente;
- b) disociar las células del material adherente exponiéndolas a un agente de disociación;
- c) hacer vibrar el material adherente durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para liberar las células del material adherente; y
- 10 d) recuperar las células;

en donde la cesta incluye una pared ubicada perpendicularmente a una pantalla superior y una pantalla inferior, teniendo cada pantalla perforaciones en las mismas;

- 15 en donde la cesta está unida operativamente a un vibrador configurado para transmitir movimiento vibratorio a la cesta y su contenido; y
- en donde el material adherente proporciona una matriz tridimensional a la que se unen las células.

2. El método de la reivindicación 1,

- 20 a) que comprende además hacer vibrar el material adherente durante un periodo de tiempo a una frecuencia y amplitud suficientes para retirar las células liberadas del material; y/o
- b) en donde el material adherente tiene carga electrostática y/o está recubierto con colágeno o gelatina; y/o
- c) en donde el material adherente comprende uno o más de un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona,
- 25 un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli L láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón, vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal; y/o
- d) en donde el agente de disociación es tripsina, papaína, elastasa, hialuronidasa, colagenasa de tipo 1, colagenasa de tipo 2, colagenasa de tipo 3, colagenasa de tipo 4, dispasa o una combinación de las mismas; y/o
- 30 e) en donde las células son células humanas; y/o
- f) en donde el material adherente se hace vibrar por un movimiento oscilante sustancialmente lineal; y/o
- g) en donde las células recogidas se caracterizan por uno o más de: (i) al menos 50 % de la viabilidad celular; (ii) al menos 50 % de la eficacia de recogida; (iii) un índice de vitalidad menor de o igual a 0,5; o (iv) una población celular heterogénea.

35 3. El método de la reivindicación 2, en donde

- 40 a) la matriz tridimensional está incluida en un lecho empaquetado dentro de un biorreactor y/o comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras, o combinaciones de las mismas; y/o
- b) la celulosa es acetato de celulosa; y/o
- c) el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina; y/o
- 45 d) la tripsina es tripsina recombinante; y/o
- e) las células humanas son células estromales adherentes; y/o
- f) el movimiento oscilante tiene una amplitud de entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 750 mm y una frecuencia de 1 a 6 Hz; y/o
- 50 g) la amplitud del movimiento oscilante sustancialmente lineal es una distancia que es 15-100 % de la altura de una cesta que contiene el material adherente.

4. El método de la reivindicación 3, en donde

- a) las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas; y/o
- b) las perlas son lisas o porosas; y/o
- 55 c) el origen de las células estromales adherentes es la placenta, el tejido adiposo o la médula ósea.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la duración del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 segundo, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 20 minutos.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 5 Hz y la duración es de aproximadamente 30 segundos o menos; o en donde la amplitud es de aproximadamente 25 mm.

7. Un aparato que comprende un material adherente contenido en una cesta que está dentro de un recipiente y un vibrador para transmitir un movimiento oscilante al material adherente, comprendiendo el vibrador uno o más controles para ajustar la amplitud y la frecuencia del movimiento oscilante, en donde el vibrador está configurado para vibrar de una manera que provoca que las células unidas al material adherente se desprendan del material adherente,

65 en donde la cesta incluye una pared ubicada perpendicularmente a una pantalla superior y una pantalla inferior,

teniendo cada pantalla perforaciones en las mismas;
en donde la cesta está unida operativamente al vibrador configurado para transmitir movimiento vibratorio a la cesta y su contenido; y
en donde el material adherente es una matriz 3D.

- 5
8. El aparato de la reivindicación 7, en donde
- a) el aparato es un biorreactor; y/o
 - b) el vibrador transmite un movimiento oscilante sustancialmente lineal al material adherente.
- 10
9. El aparato de la reivindicación 8, en donde
- a) el biorreactor es un biorreactor de flujo de tapón, un biorreactor de tanque agitado continuo, un biorreactor de lecho estacionario, un biorreactor de agitación por aire o una perfusión de siembra celular;
15 y/o
 - b) el biorreactor es un biorreactor de flujo de tapón que comprende una matriz tridimensional de lecho empaquetado y el dispositivo oscilante comprende una cesta que envuelve sustancialmente el lecho empaquetado; y/o
 - c) la matriz tridimensional comprende uno o más de un poliéster, un polipropileno, un polialquileno, un polifluorocloroetileno, un cloruro de polivinilo, una resina de fluoruro de polivinilo, un poliestireno, una polisulfona,
20 un poliuretano, un tereftalato de polietileno, una celulosa, una fibra de vidrio, una partícula de cerámica, un matrigel, un componente de la matriz extracelular, un colágeno, un ácido poli L láctico, un dextrano, una fibra de metal inerte, sílice, vidrio de natrón, vidrio de borosilicato, quitosano o una esponja vegetal; y/o
 - d) la matriz tridimensional comprende un armazón de una sola pieza, múltiples perlas, múltiples vehículos, microfibras, nanofibras, o combinaciones de las mismas; y/o
 - e) la matriz tridimensional tiene carga electrostática o está recubierta con colágeno o gelatina; y/o
 - f) el movimiento oscilante tiene una amplitud de entre aproximadamente 10 mm y aproximadamente 750 mm y una
25 frecuencia de 1 a 6 Hz.
- 30
10. El biorreactor de la reivindicación 9, en donde
- a) la celulosa es acetato de celulosa; y/o
 - b) el componente de la matriz extracelular es uno o más de fibronectina, vitronectina, condronectina o laminina;
y/o
 - c) las microfibras o nanofibras son tejidas o no tejidas; y/o
 - d) las perlas son lisas o porosas; y/o
 - e) la frecuencia del movimiento oscilante es de aproximadamente 1 Hz; y/o la amplitud es de aproximadamente
35 25 mm.

Figura 1B

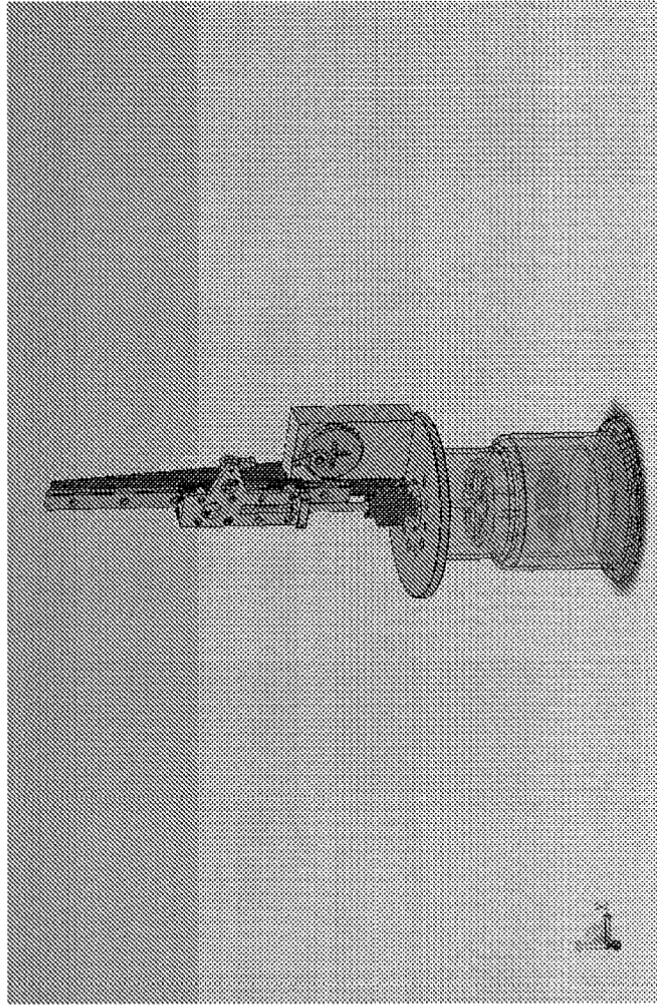


Figura 1A

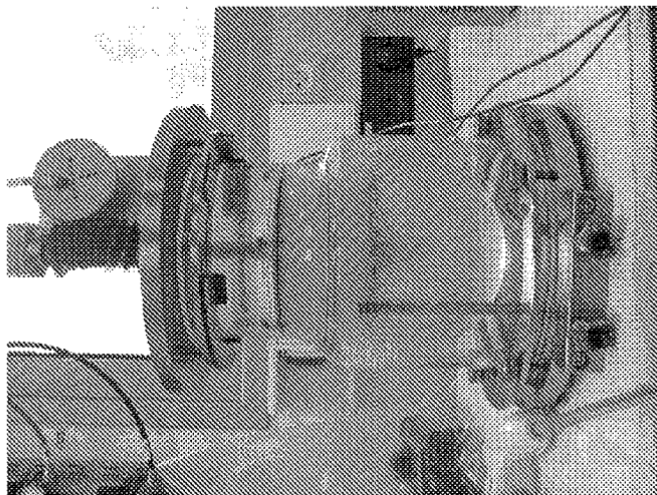


Figura 2

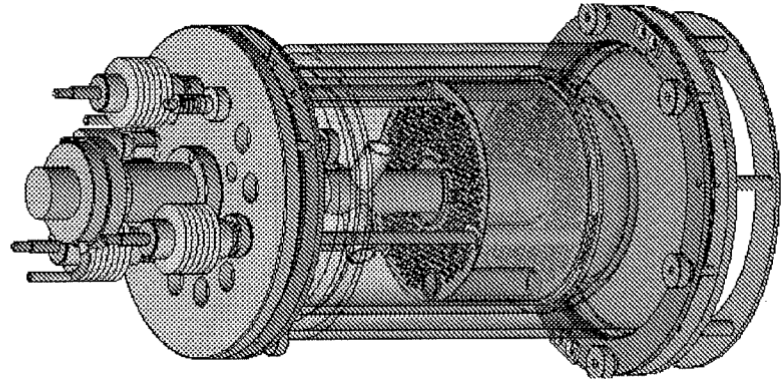
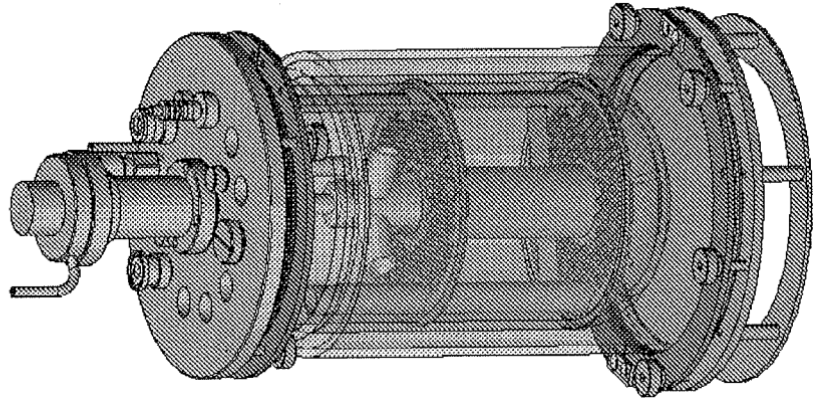


Figura 3



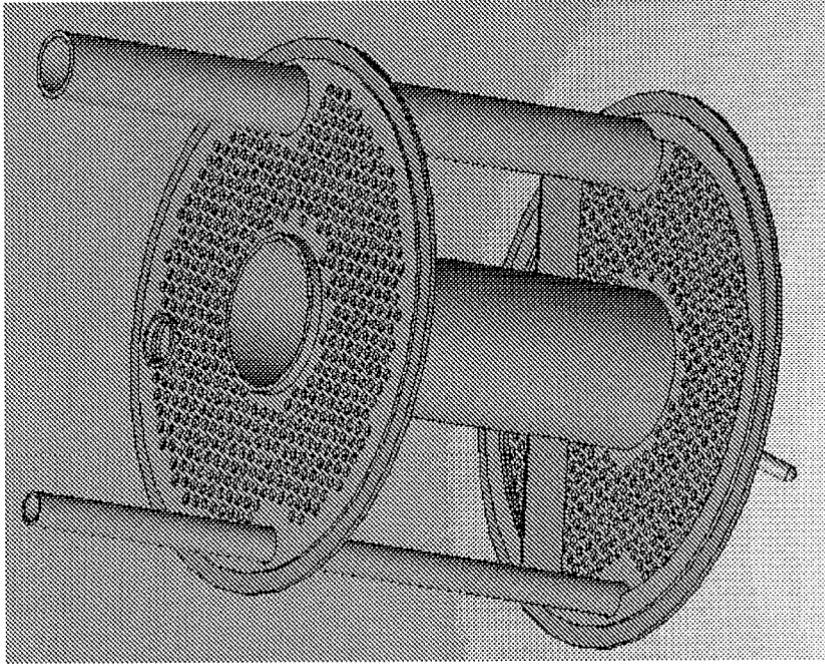


Figura 4A

Figura 4C

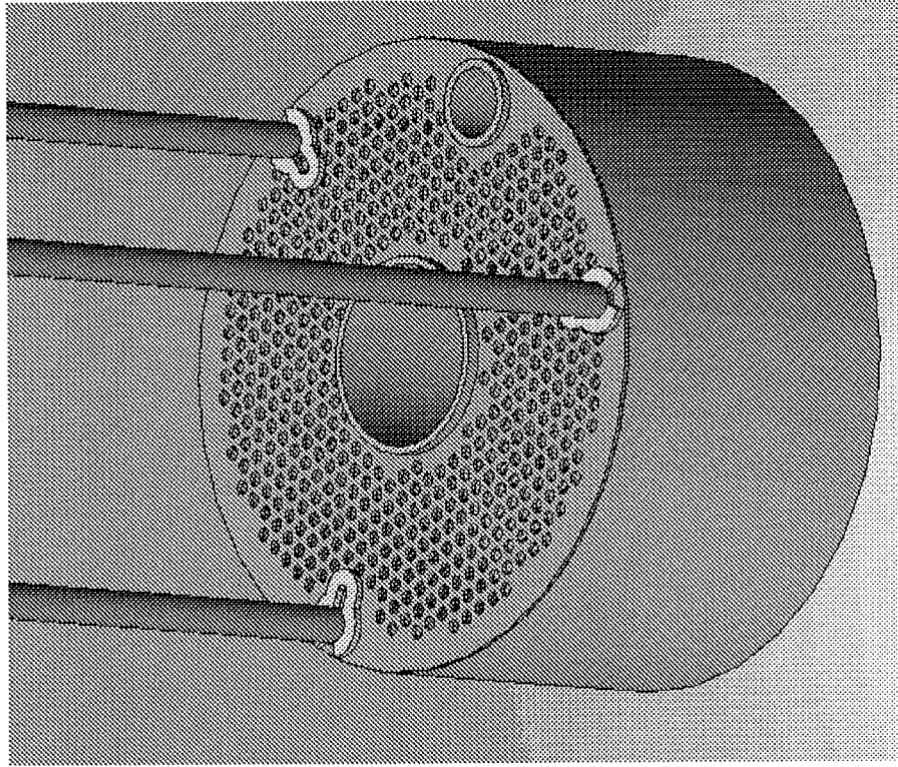
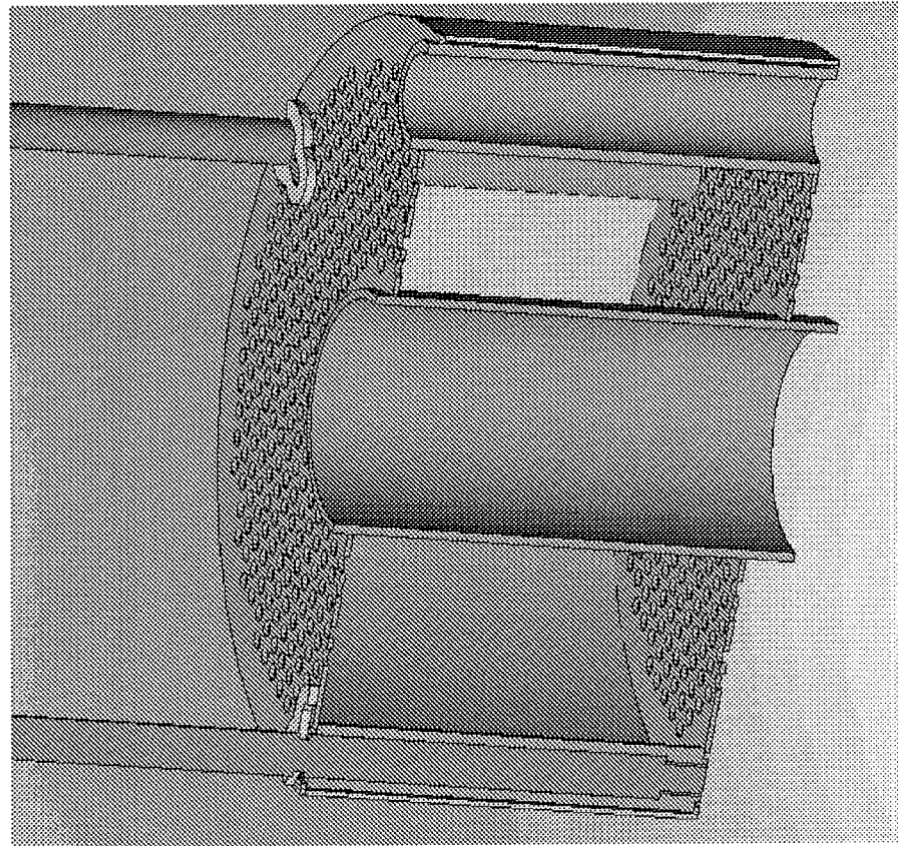


Figura 4B



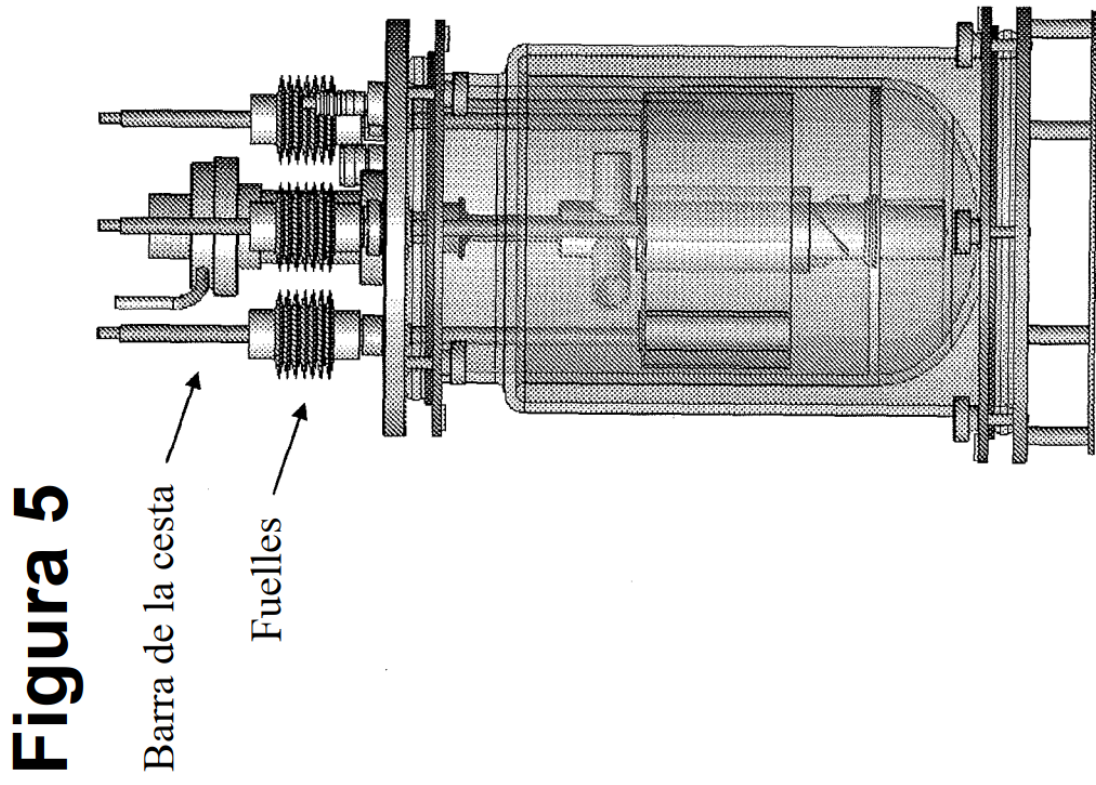


Figura 6

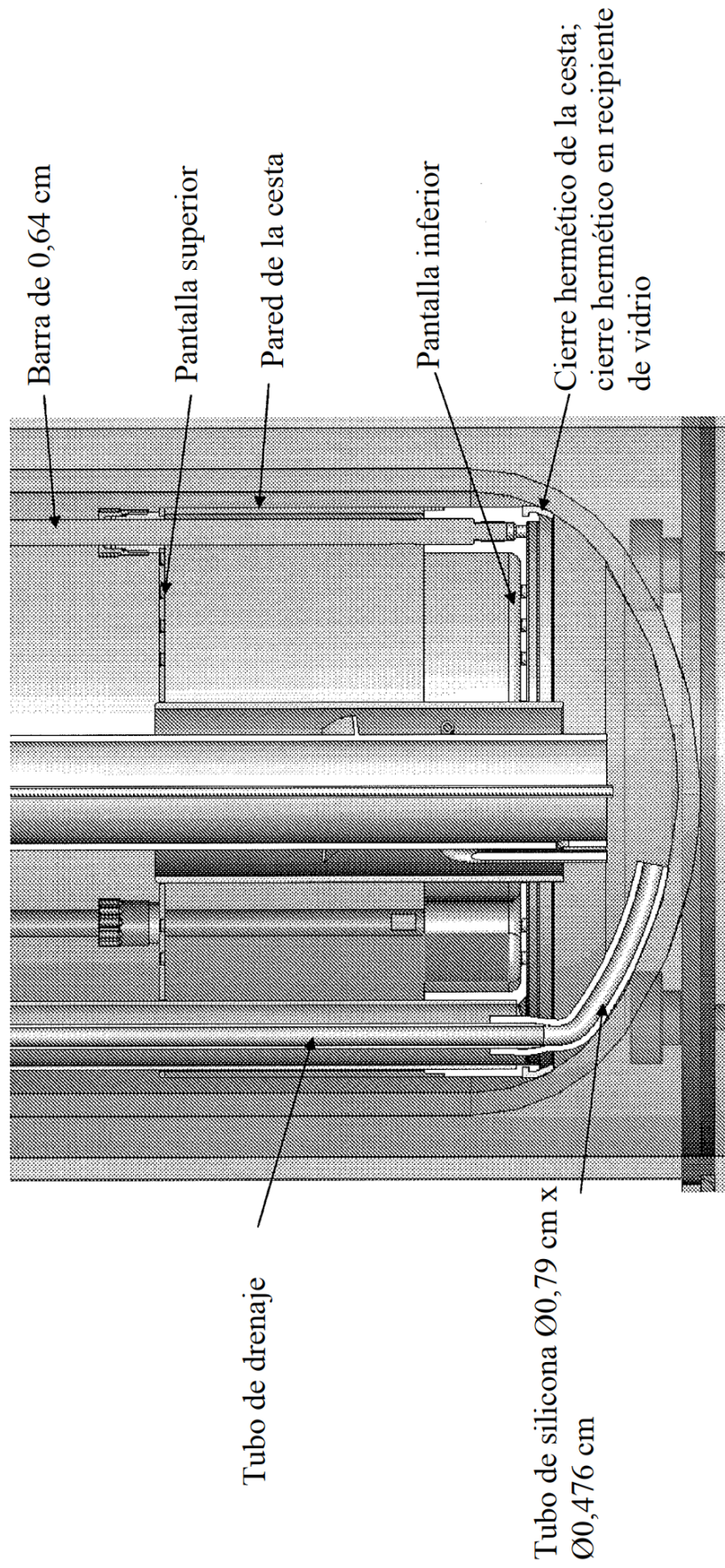
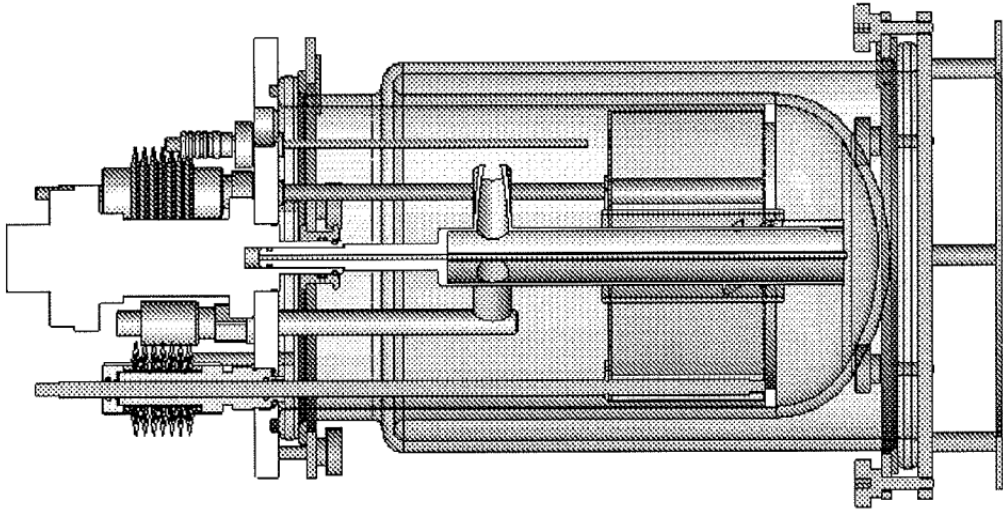


Figura 7



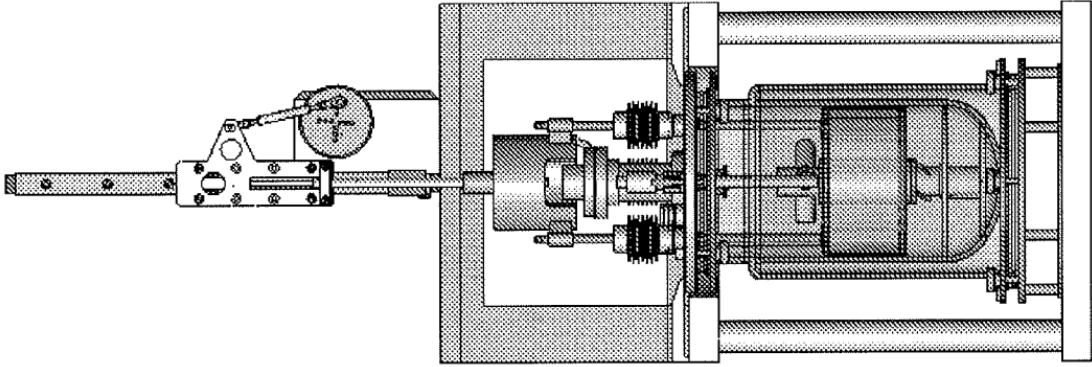


Figura 8

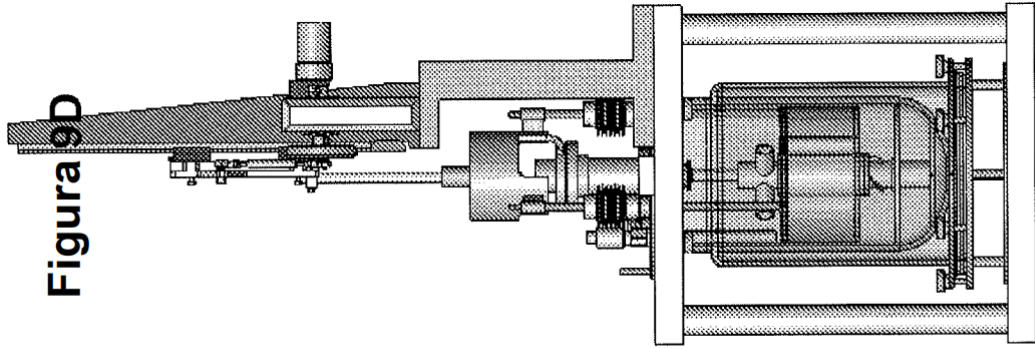


Figura 9D

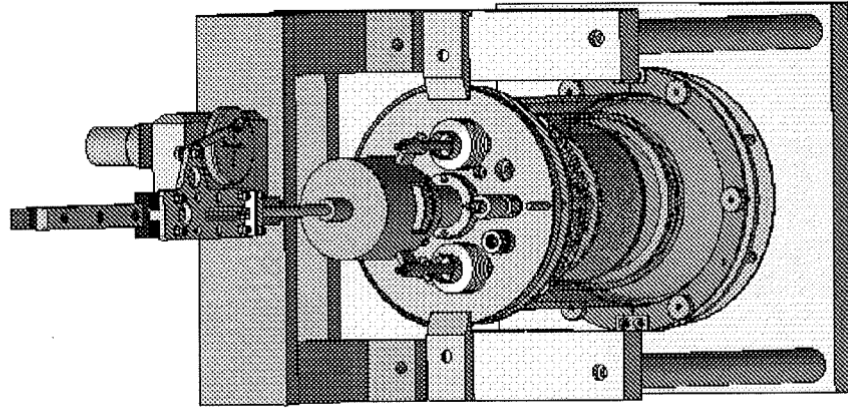


Figura 9C

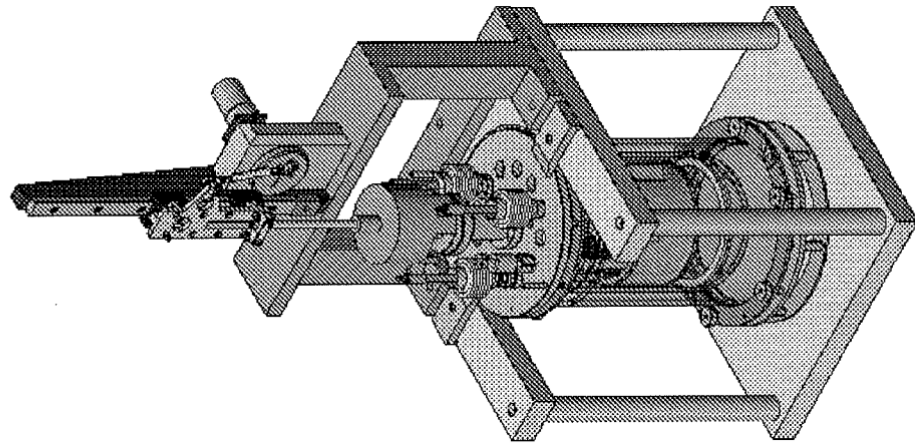


Figura 9B

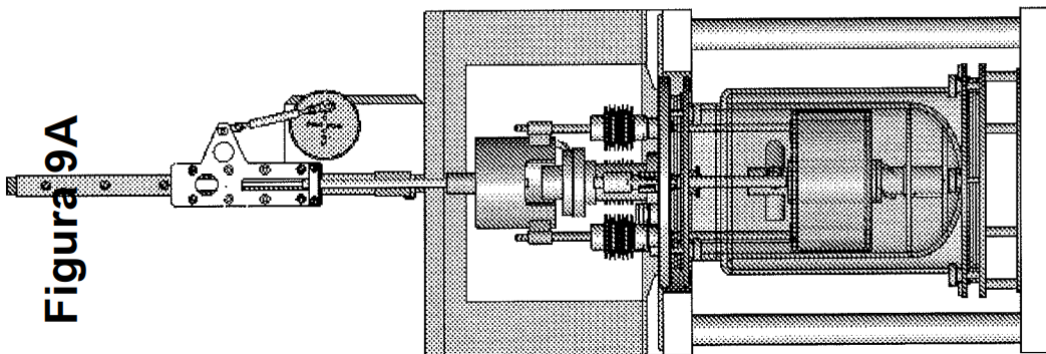


Figura 9A

Figura 10

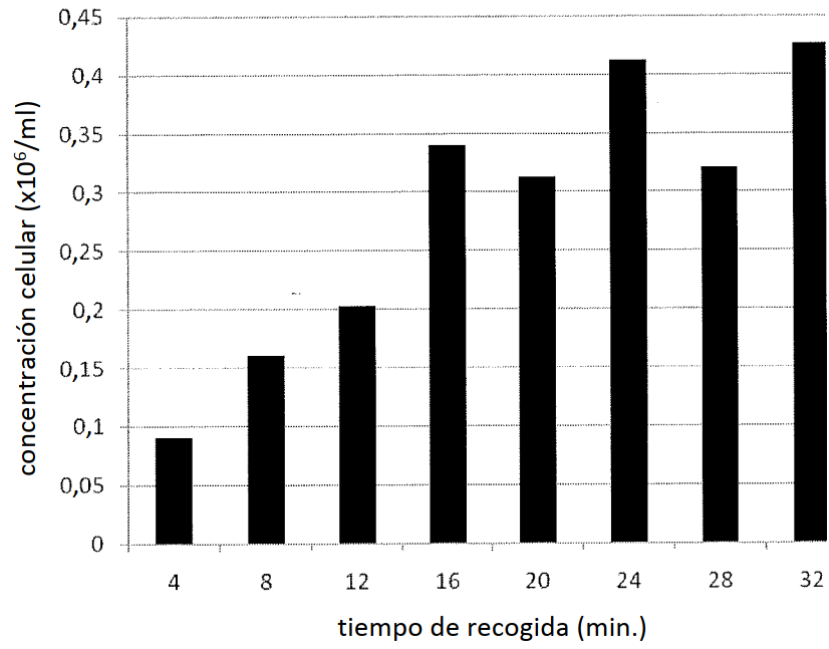


Figura 11

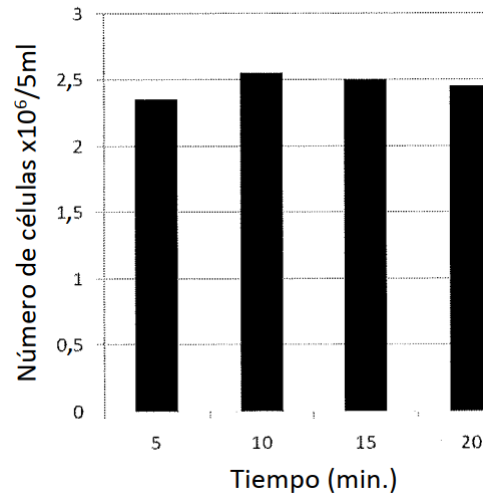


Figura 12

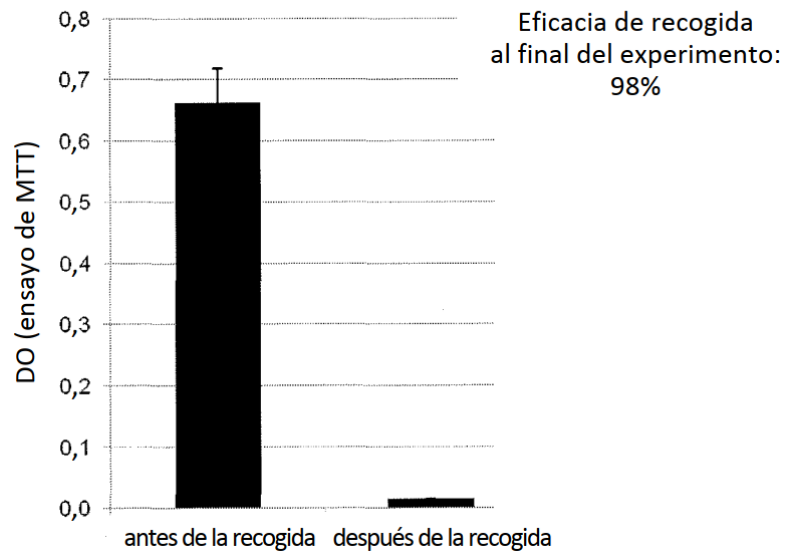


Figura 13

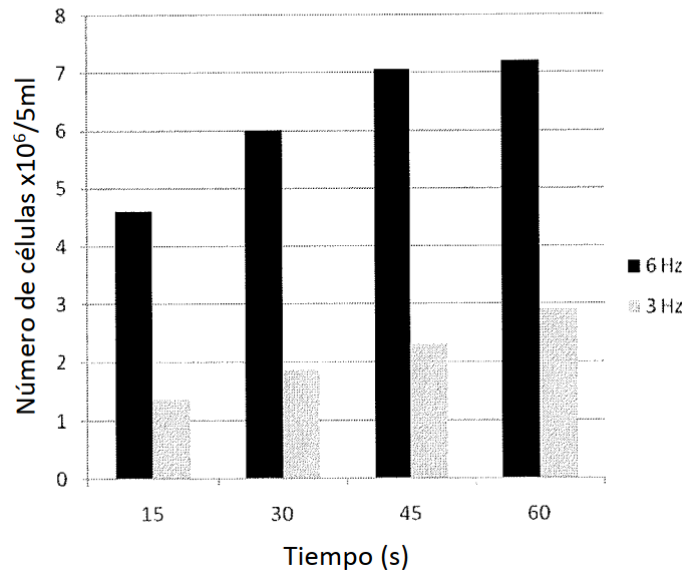


Figura 14

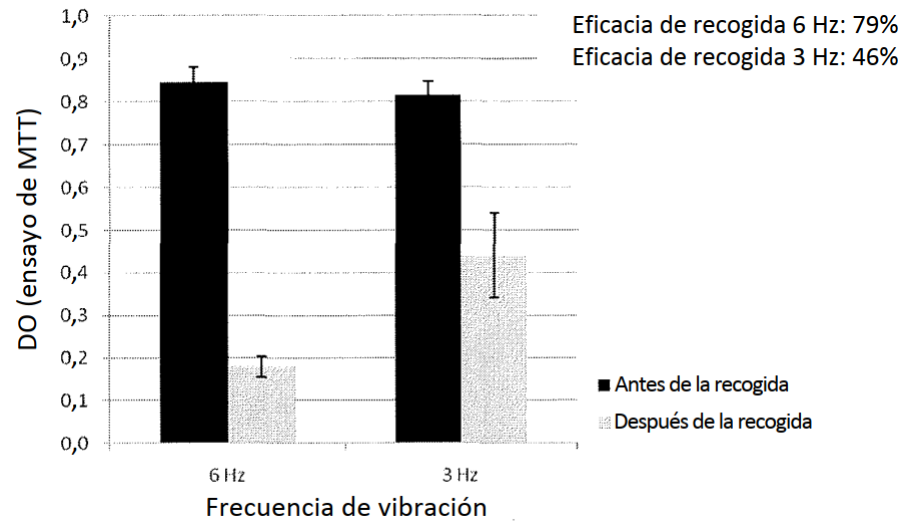


Figura 15

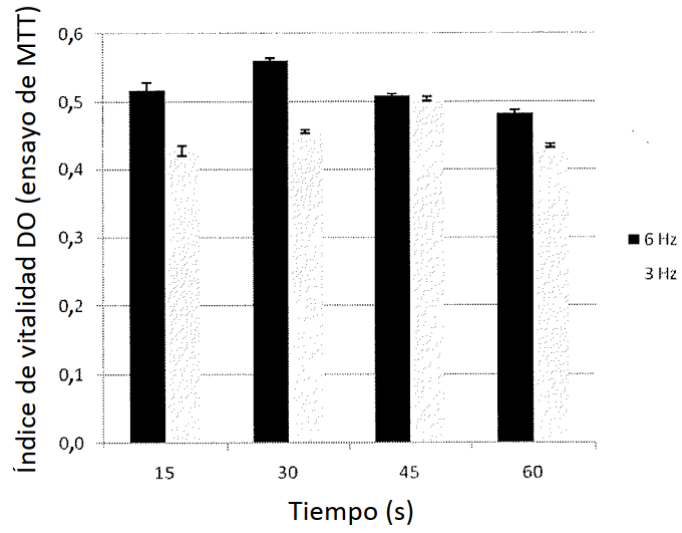


Figura 16

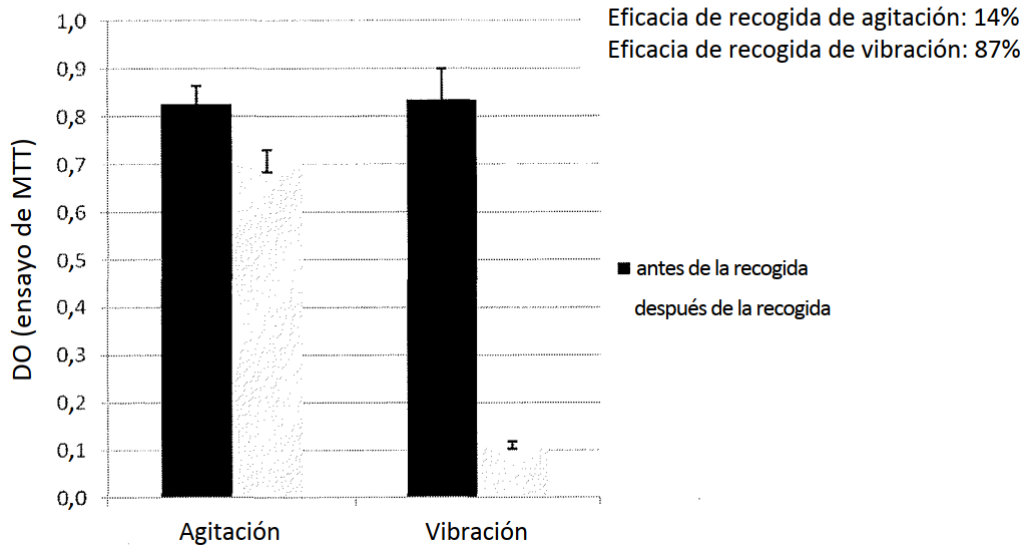


Figura 17

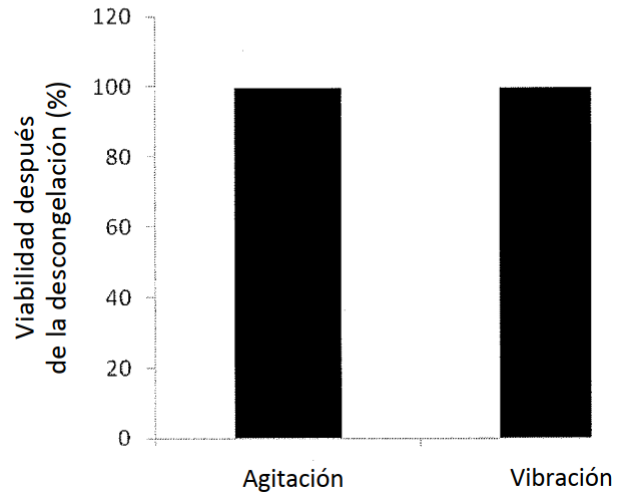


Figura 18

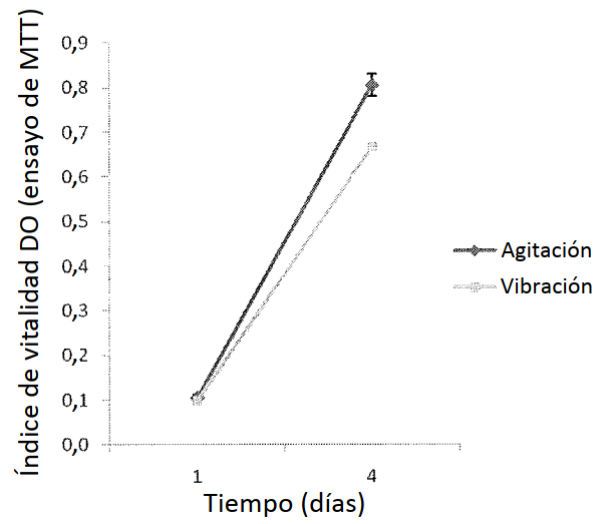


Figura 19

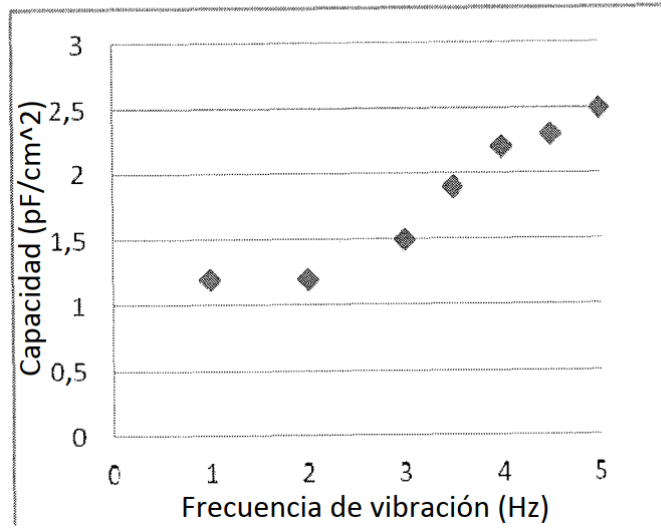


Figura 20

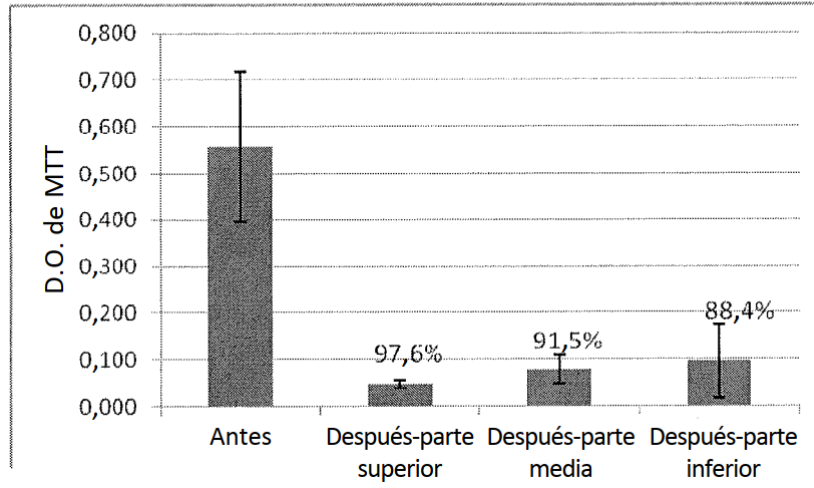


Figura 21

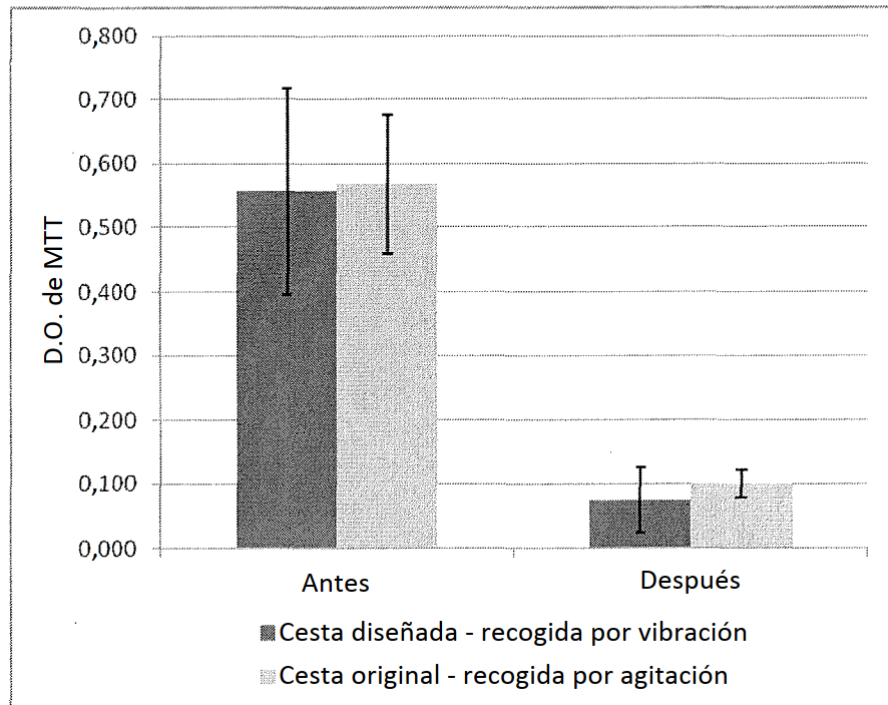


Figura 22

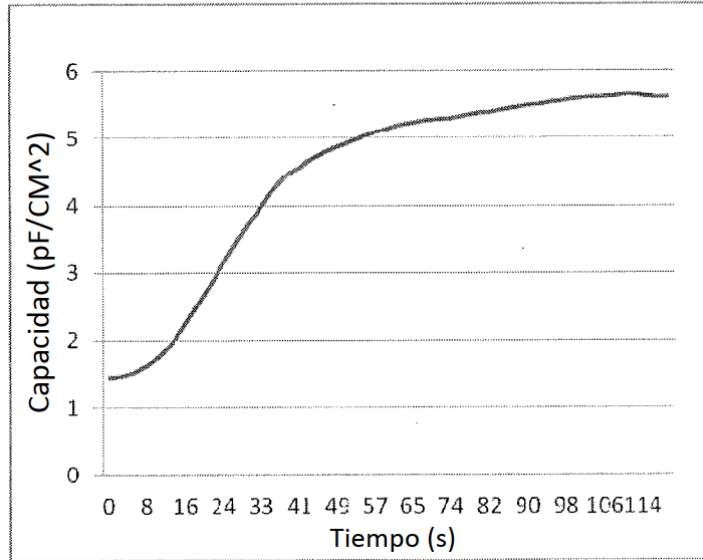


Figura 23

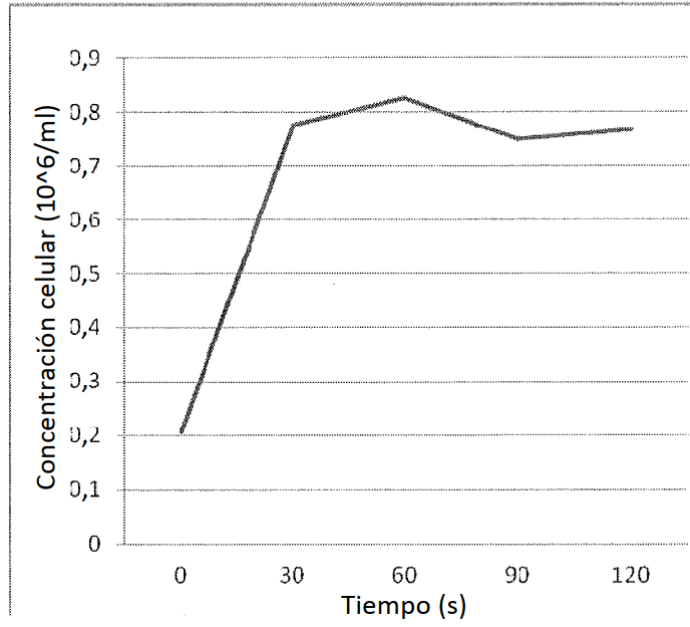


Figura 24

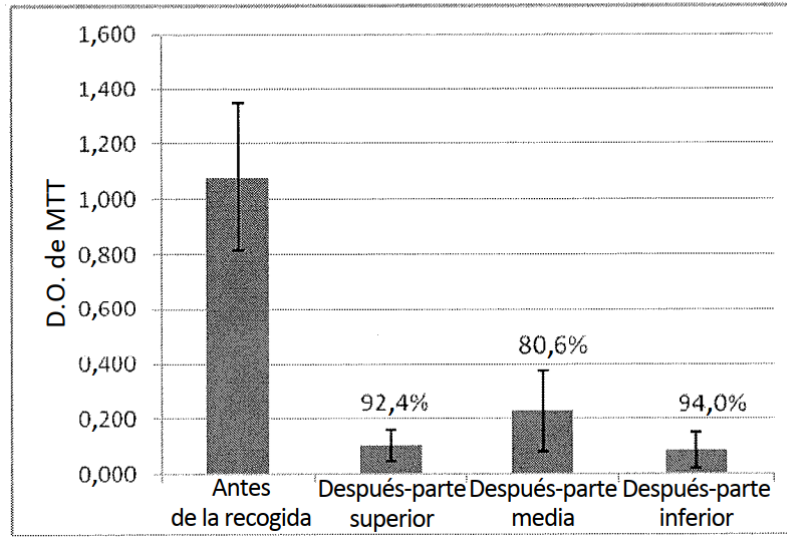


Figura 25

