

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 396**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/50 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2020** **PCT/SE2020/050993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2021** **WO21076042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2020** **E 20800356 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3886880**

54 Título: **Procedimientos y aparatos para la obtención de células madre mesenquimales amnióticas a partir de líquido amniótico y sus células derivadas**

30 Prioridad:

18.10.2019 SE 1930338

18.10.2019 US 201962923187 P

26.03.2020 SE 2030100

26.03.2020 SE 2030101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2023

73 Titular/es:

AMNIOTICS AB (100.0%)

Scheelevägen 2

223 63 Lund, SE

72 Inventor/es:

TALTS, JAN;

WOODS, NIELS-BJARNE;

ENGKILDE, KÅRE y

LARSSON, MARCUS

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 951 396 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

Procedimientos y aparatos para la obtención de células madre mesenquimales amnióticas a partir de líquido amniótico y sus células derivadas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para purificar, cultivar y seleccionar subpoblaciones de células madre mesenquimales (MSC) con especificidad de tejido de calidad neonatal para uso en la producción de medicamentos terapéuticos avanzados.

Antecedentes de la invención

- 10 El líquido amniótico es el líquido que rodea y protege al feto durante el embarazo. Durante el último trimestre, el líquido amniótico es secretado en parte por el pulmón fetal y en parte por la orina fetal. El líquido amniótico se ingiere por vía oral y se absorbe por el intestino del feto, con lo que vuelve a ingresar en la circulación fetal. El líquido amniótico de término completo consiste en agua con electrolitos, pero también contiene proteínas, hidratos de carbono, lípidos, fosfolípidos y urea. Además de desechos metabólicos, el líquido amniótico también contiene células fetales y otros materiales desprendidos de la piel, como pelo y vernix, un depósito graso que reviste la piel del bebé al nacer. Las interfaces tisulares en contacto con el líquido amniótico contribuyen a que el contenido del líquido amniótico incluya material celular. El pulmón es la mayor de esas superficies, que también segrega tensioactivo pulmonar en el TAF. La mucosa oral y nasal, el ojo y el tracto urinario son otras de estas superficies con una interfaz epitelial no queratinizada en contacto topológico con el líquido amniótico.

- 20 Las células madre mesenquimales (MSC) pueden encontrarse en casi todos los tejidos y se localizan principalmente en nichos perivasculares. Como comprenderá un experto en la técnica, las células madre mesenquimales son células estromales multipotentes capaces de diferenciarse en numerosos tipos celulares, y también poseen propiedades antiinflamatorias y angiogénicas para dirigir los procesos de reparación tisular, lo que hace que las células madre mesenquimales sean valiosas para tratamientos terapéuticos.

- 25 El documento WO 2018/083700 A1 de EXOSTEM BIOTEC LTD se titula "Mesenchymal stem cells populations, their products, and use thereof". Moraghebi et al., 2017 se titula "Term amniotic fluid: an unexploited reserve of mesenchymal stromal cells for reprogramming and potential cell therapy applications". Spitzhorn et al., 2017 se titula "Isolation and Molecular Characterization of Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Obtained from Caesarean Sections". Bossolasco et al., 2006 se titula "Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential". Lesage et al., 2017 se titula "The amniotic fluid as a source of mesenchymal stem cells with lung-specific characteristics". El documento US 2011/256110 A1 del Los Angeles Childrens Hospital se titula "Amniotic fluid cells and uses thereof". El documento US 2018/059109 A1 de MERIDIGEN BIOTECH CO LTD se titula "Method of distinguishing mesenchymal stem cells and method of determining purity of mesenchymal stem cells". El documento WO 2018/083700 A1 de EXOSTEM BIOTEC LTD se titula "Mesenchymal stem cells populations, their products, and use thereof".

- 35 El líquido amniótico de término (TAF) recogido durante una cesárea contiene una serie de células valiosas, incluidas las MSC. Sin embargo, la extracción y el cultivo de las MSC no se ha realizado anteriormente a gran escala debido a las dificultades asociadas a la recogida estéril, la manipulación del TAF y la identificación y extracción de las MSC. Además, es probable que subpoblaciones específicas de MSC resulten especialmente adecuadas para la producción de fármacos terapéuticos. Anteriormente, las MSC procedentes de médula ósea adulta, tejido adiposo adulto o tejidos neonatales asociados al nacimiento, como la placenta, el cordón umbilical y la sangre del cordón umbilical, se utilizaban ampliamente para obtener MSC. Las MSC procedentes de estos tejidos neonatales pueden tener capacidades adicionales en comparación con las MSC derivadas de fuentes adultas. De hecho, varios estudios han informado de propiedades biológicas superiores, como la mejora de la capacidad proliferativa, la duración de la vida y el potencial de diferenciación de las MSC procedentes de tejidos asociados al nacimiento frente a las MSC derivadas de adultos. Sin embargo, ninguna de estas fuentes neonatales de MSC tiene un tejido u órgano correspondiente en el cuerpo adulto. Por lo tanto, sería extremadamente beneficioso disponer de MSC de calidad neonatal con especificidad tisular. Además, la adquisición de material fetal puede estar relacionada con consecuencias negativas para el lactante. Por ejemplo, en la extracción de sangre del cordón umbilical se ha demostrado que debe devolverse al bebé la mayor cantidad posible de sangre para mejorar su supervivencia, crecimiento y desarrollo de la motricidad fina. En cambio, el líquido amniótico se considera hoy día un residuo médico que se desecha. Por tanto, el incentivo ético y práctico para explotar un recurso tan inexplorado es evidente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención describe un procedimiento para obtener células de líquido amniótico de término (células TAF) a partir de líquido amniótico de término, que puede comprender:

- 55 del líquido amniótico de término (TAF) proporcionado;
eliminar la materia particulada del TAF para obtener células de TAF purificadas;

realizar la selección de adherencia en las células TAF purificadas para obtener células de adherencia TAF;

realizar un pasaje de las células de adherencia TAF para obtener una población de células comprendiendo las células TAF; y

- 5 seleccionar las células TAF de la población como células que expresan al menos un marcador de superficie que es CD248.

La población de células también se denomina en la presente memoria células madre mesenquimales TAF (TAF MSC o TAF-MS).

Los marcadores de superficie del grupo B consisten en PCDH19, DDR1, MME, IFITM10, BGN, NOTCH3, SULF1, TNFSF18, BDKRB1, FLT1, PDGFRA, TNFSF4, UNC5B, FAP, CASP1, CD248, DDR2, PCDH18, LRRC38 y CRLF1.

- 10 La selección de células TAF puede comprender además seleccionar las células TAF de la población como células que expresan al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en PCDH19, DDR1, MME, IFITM10, BGN, NOTCH3, SULF1, TNFSF18, BDKRB1, FLT1, PDGFRA, TNFSF4, UNC5B, FAP, CASP1, DDR2, PCDH18, LRRC38 y CRLF1.

- 15 La selección de células TAF puede comprender excluir las MSC que expresan un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD24, ITGB4, TNFSF10, GFRA1, CD74, FGFR4, HAVCR1 y OSCAR. La etapa de selección puede comprender seleccionar células TAF que expresen al menos dos marcadores de superficie de los marcadores de superficie del Grupo B, en el que un marcador de superficie es CD248. La etapa de selección puede comprender seleccionar células TAF que expresen al menos tres marcadores de superficie de los marcadores de superficie del Grupo B, en el que un marcador de superficie es CD248. La etapa de selección puede comprender seleccionar células TAF que expresen al menos cuatro marcadores de superficie de los marcadores de superficie del Grupo B, en el que un marcador de superficie es CD248. La etapa de selección puede comprender seleccionar células TAF que expresen un marcador de superficie seleccionado del grupo de CD248, DDR1 y LRRC38. La etapa de selección comprende seleccionar TAF MSC que expresan CD248. La etapa de selección puede comprender seleccionar TAF MSC que expresen CD248 en combinación con un marcador seleccionado del grupo de DDR1 y LRRC38. La etapa de selección puede comprender seleccionar TAF MSC que expresan CD248, DDR1 y LRRC38. En algunos ejemplos, las células TAF aisladas expresan además al menos un marcador de superficie del Grupo A.

- En algunos ejemplos, la población aislada de células TAF, puede expresar además al menos un marcador de superficie del Grupo A seleccionado del grupo que comprende el miembro 3K de la familia del dominio TBC1, el factor inflamatorio de aloinjerto de tipo 1, el miembro 1 de la familia relacionada con la cadherina, la ATPasa transportadora de sodio/potasio de interacción 4, el miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP, la proteína asociada a vesículas de membrana plasmática, la mesotelina, la molécula de adhesión celular L1, el receptor celular 1 del virus de la hepatitis A, mal, proteína de diferenciación de células T 2 (gen/pseudogén), miembro 7 de la familia SLAM, doble dominio C2 beta, molécula de adhesión de células endoteliales, subunidad beta1 del receptor de ácido gamma-aminobutírico tipo A, cadherina 16, miembro 3 de la superfamilia de las inmunoglobulinas, desmocolina 3, regulador de la hemoglobinización y de la expansión celular eritroide, proteína 1 de interacción con el canal de potasio activado por voltaje, molécula CD70, receptor alfa 1 de la familia GDNF, componente 3 del complejo de polaridad celular de crumbs, claudina 1, nueva transcripción del canal de sodio activado por voltaje de subunidad alfa 5, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 4, canal de potasio con dominio de dos poros de subfamilia K miembro 3, disferlina, efrina A1, canal de potasio rectificador interno de subfamilia J miembro 16, dedo 1 tipo ring-CH asociado con membrana, sinaptotagmina tipo 1, calsinténina 2, integrina subunidad beta 4, proteína membrana 8 asociada con vesícula, miembro C de grupo 5 de clase C acoplado a receptor de proteína G, molécula CD24, receptor de tipo G 2 de siete dominios de cadherina EGF LAG, cadherina 8, proteína de interacción del receptor de glutamato 1, proteína de unión a la actina dematina, receptor F11, molécula de adhesión celular 1, cadherina 6, receptor de trombina similar al factor de coagulación II 2, dominio LY6/PLAUR que contiene 1, miembro 6 de la familia de transportadores de solutos, desmogleína 2, receptor de adhesión acoplado a proteína G G1, receptor de colecistoquinina A, receptor de oxitocina, subunidad de integrina alfa 3, molécula de adhesión con dominio Ig tipo 2, receptor 1 tipo G de siete dominios cadherina EGF LAG, y receptor EPH B2.

- En algunos ejemplos, una composición puede comprender la población aislada de células TAF descrita anteriormente y un portador aceptable para uso farmacéutico para las células TAF. Las células TAF aisladas obtenibles por un procedimiento descrito anteriormente expresan CD248, y pueden expresar además al menos un marcador de superficie del Grupo B seleccionado del grupo que consiste en PCDH19, DDR1, MME, IFITM10, BGN, NOTCH3, SULF1, TNFSF18, BDKRB1, FLT1, PDGFRA, TNFSF4, UNC5B, FAP, CASP1, DDR2, PCDH18 y CRLF1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 55 La Fig. 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas en la purificación, cultivo y selección de subpoblaciones de MSC.

La Fig. 2 es un diagrama que ilustra un procedimiento de recolección de líquido amniótico.

La Fig. 3 es una ilustración esquemática, en una vista en perspectiva, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 4 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

5 La Fig. 5 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 6 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

10 La Fig. 7 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 8 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

Fig. 9 una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

15 La Fig. 10 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 11 es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

20 La Fig. 12a es una ilustración esquemática, en una vista lateral transversal, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 12b es una ilustración esquemática, a lo largo de una sección transversal A-A de la Fig. 10a, de un aparato para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 13 es un diagrama de flujo de un procedimiento de filtrado de líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo.

25 La Fig. 14 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para el cálculo de una puntuación de especificidad de tejido MSC de acuerdo con un ejemplo.

La Fig. 15 es un gráfico de ejemplo que muestra las puntuaciones de especificidad del tejido MSC que representan los umbrales del 5% y el 15%.

30 La Fig. 16 es un gráfico de ejemplo que muestra datos priorizados por tejido y distales por tejido, incluidos datos priorizados por tejido superiores al percentil 15%.

Las Figs. 17A-17D muestran los resultados de un estudio de ejemplo que demuestra los efectos del uso de MSC de pulmón TAF para tratar ratas con fibrosis pulmonar inducida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS EJEMPLOS PREFERENTES

35 Los procedimientos de purificación, cultivo y selección de subpoblaciones de MSC con calidad neonatal y especificidad de tejido adulto se resumen en la Figura 1 y se describen en detalle a continuación.

Recolección de líquido amniótico, que no forma parte del procedimiento reivindicado.

40 El líquido amniótico puede recolectarse para producir líquido amniótico de término (TAF) de acuerdo con los procedimientos descritos en la Solicitud de Patente de los EE. UU. Núm. 14/776.499 (correspondiente al documento US2016/0030489). Específicamente, la FIG. 2 es un diagrama de bloques de un ejemplo de procedimiento 300 de recolección de líquido amniótico, de acuerdo con un ejemplo ejemplar de la invención. Debe apreciarse que el procedimiento 300 puede incluir cualquier número de tareas adicionales o alternativas. Las tareas mostradas en la FIG. 3 no tienen por qué realizarse en el orden ilustrado, y el procedimiento 300 puede incorporarse a un procedimiento o proceso más completo con funcionalidades adicionales no descritas en detalle en la presente memoria.

45 Como se muestra en la FIG. 2, el procedimiento 300 puede incluir la realización de una incisión en la pared uterina 301 de una madre embarazada, por ejemplo, durante una cesárea. La etapa 301 puede realizarse con un bisturí médico estándar. Como también se muestra en la FIG. 2, el procedimiento 300 puede incluir la inserción de un colector de líquido amniótico 302 a través de la incisión en la pared uterina realizada en la etapa 301. El procedimiento 300 también incluye penetrar la membrana amniótica 303 utilizando el colector de líquido amniótico de la etapa 302. La

etapa 303 también puede incluir la penetración de la membrana coriónica. En un aspecto, la punta se inserta a una profundidad de 10 cm. En algunos ejemplos, la punta se inserta a una profundidad de entre aproximadamente 3 cm y aproximadamente 30 cm. En algunos ejemplos, la punta se inserta a una profundidad de aproximadamente 4 cm, aproximadamente 5 cm, aproximadamente 6 cm, aproximadamente 7 cm, aproximadamente 8 cm, aproximadamente 9 cm, aproximadamente 10 cm, aproximadamente 11 cm, aproximadamente 12 cm, aproximadamente 13 cm, aproximadamente 14 cm, aproximadamente 15 cm, aproximadamente 16 cm, aproximadamente 17 cm, aproximadamente 18 cm, aproximadamente 19 cm, aproximadamente 20 cm, aproximadamente 21 cm, aproximadamente 22 cm, aproximadamente 23 cm, aproximadamente 24 cm, aproximadamente 25 cm, aproximadamente 26 cm, aproximadamente 27 cm, aproximadamente 28 cm o aproximadamente 29 cm.

El procedimiento 300 incluye además recolectar el líquido amniótico 304 del saco amniótico utilizando el colector de líquido amniótico de la etapa 302. La etapa 304 puede incluir iniciar un sifón para transferir el líquido amniótico a una cámara de recolección del colector de líquido amniótico, como por ejemplo abriendo una válvula de entrada del colector de líquido amniótico. La etapa 304 también puede incluir la colocación de una cámara de recolección del colector de líquido amniótico por debajo de una entrada del colector de líquido amniótico. La etapa 304 también puede incluir el acoplamiento de una fuente de presión negativa a una salida del colector de líquido amniótico para iniciar la transferencia del líquido amniótico. La etapa 304 puede incluir la reubicación de una entrada del colector de líquido amniótico para recuperar sustancialmente todo el líquido amniótico disponible.

Finalmente, el procedimiento 300 incluye retirar el colector de líquido amniótico 905 del saco amniótico. La etapa 905 puede incluir el cierre de una válvula de entrada del colector de líquido amniótico. En un ejemplo, no se observa sangre en el material recolectado. La etapa 905 también puede incluir el vaciado del sistema de recolección para su uso/procesamiento posterior y la esterilización del exterior de todo el dispositivo. En un ejemplo, el exterior se esteriliza utilizando etanol al 70% para que la esterilidad pueda mantenerse en cualquier etapa posterior al procesamiento, como en una configuración de banco de flujo de aire laminar, por ejemplo, para el aislamiento de material celular de acuerdo con la presente invención, y para el almacenamiento de fluidos.

En un ejemplo, el procedimiento de recolección de líquido amniótico se realiza en menos de un minuto. En un ejemplo, el procedimiento de recolección de líquido amniótico se realiza en uno o dos minutos. En un ejemplo, el procedimiento de recolección de líquido amniótico se realiza en no más de tres minutos. En un ejemplo, el procedimiento se simplifica en comparación con los procedimientos operativos estándar para las cesáreas, por ejemplo, evitando el derrame del líquido amniótico en la herida operatoria, mejorando la visibilidad y el acceso físico. En un ejemplo, la piel del feto no se ve afectada por la punta del dispositivo.

Purificación

El líquido amniótico de término (TAF) se purifica filtrando el líquido amniótico de término para eliminar el vórnix. Aunque el término "líquido amniótico de término" se emplea en la presente memoria y en otras partes de la presente divulgación, se entiende que los procedimientos, procesos y dispositivos de la presente divulgación pueden aplicarse a todos los líquidos amnióticos y no sólo al líquido amniótico de término. El líquido amniótico de término puede ser líquido amniótico recolectado en partos por cesárea a término utilizando, por ejemplo, un sistema cerrado basado en catéter. A efectos de la presente descripción, el "líquido amniótico de término" puede ser líquido amniótico recolectado en cesáreas planificadas después de 37 semanas completas de embarazo o más tarde, o en cesáreas planificadas cerca del término, por ejemplo después de 36 semanas completas de embarazo. Preferentemente, el líquido amniótico de término se extrae en las cesáreas programadas durante la semana 37 de embarazo o más tarde.

La Fig. 3 es una ilustración esquemática de un aparato 100 para filtrar líquido amniótico de acuerdo con un ejemplo. El líquido amniótico contiene células amnióticas procedentes del feto o del saco amniótico, como las células madre mesenquimales. El líquido amniótico también contiene otros materiales desprendidos de la piel, como pelo y vórnix. El material diferente de las células amnióticas se denomina en la presente memoria materia particulada y puede comprender también meconio, coágulos de sangre, etc. Se puede considerar materia particulada cualquier cosa con un tamaño mayor que 20 μm . A efectos de filtrado, puede ser especialmente ventajoso tratar como partículas todo lo que supere los 30 μm o incluso los 50 μm . Opcionalmente, todo lo que sea más grande que las células amnióticas diana puede tratarse como materia particulada. De este modo, el líquido amniótico contiene generalmente una mezcla de células amnióticas y partículas. El aparato 100 comprende un filtro 101 para filtrar las partículas del líquido amniótico, y una cámara 102 que encierra el filtro 101. La cámara 102 comprende una entrada de fluido 103 y una salida de fluido 104. La cámara 102 que encierra el filtro 101 debe interpretarse como que el filtro 101 está aislado por la cámara con respecto al entorno que rodea la cámara 102, de manera que no hay comunicación fluida entre el líquido amniótico de la cámara 102 con dicho entorno. La comunicación de fluido a través de la cámara 102 se controla, por lo tanto, a través de la entrada de fluido 103 y la salida de fluido 104 en el ejemplo de la Fig. 3. El filtro 101 está unido al interior de la cámara 102 entre la entrada de fluido 103 y la salida de fluido 104. La Fig. 12 muestra un ejemplo de una sección transversal A-A como se indica en la Fig. 12 de una cámara circular 102 y un filtro 101. Sin embargo, debe comprenderse que la cámara 102 y el filtro 101 pueden tener formas variables para su optimización en diferentes aplicaciones. El aparato 100 comprende un conector de entrada 105 dispuesto para formar una conexión de sellado entre la entrada de fluido 103 y una fuente de muestra de fluido amniótico 201 (mostrada en la Fig. 4). La Fig. 4 muestra un ejemplo esquemático de dicha fuente 201 de líquido amniótico. La presencia de un conector de entrada 105 conectado a la entrada de fluido 103 y configurado para proporcionar una conexión de sellado entre la entrada de

fluido 103 directamente a una fuente 201 de fluido amniótico proporciona la minimización de la exposición a contaminantes y un manejo aséptico eficiente del fluido amniótico. Esto facilita la obtención de células amnióticas que permiten el procesamiento posterior a la filtración con un estándar de calidad mejorado. De este modo, se facilita un proceso de producción farmacéutica aséptico. Se puede facilitar la preparación de, por ejemplo, moléculas tensioactivas. El aparato 100 permite mejorar el funcionamiento de las células madre amnióticas, por ejemplo mejorando la fase de injerto tras el trasplante. Dichos procesos mejorados se hacen posibles al tener el filtro 101 encerrado en una cámara 102 y un conector de entrada 105 dispuesto para formar una conexión de sellado entre la entrada de fluido 103 de la cámara 102 y una fuente de muestra de fluido amniótico 201. De este modo se reduce el riesgo de exponer las células madre amnióticas a contaminantes, como bacterias y virus. También se minimiza la exposición al oxígeno, lo que permite reducir la formación de radicales libres de oxígeno que pueden afectar negativamente al funcionamiento de las células madre.

La Fig. 3 muestra un ejemplo en el que el conector de entrada 105 comprende un tubo 105 conectado a la entrada de fluido 103 en una primera conexión de sellado 114. El conector de entrada 105 puede formar una conexión de sellado con la entrada de fluido 103 mediante una conexión de ajuste forzado, un adhesivo, una abrazadera u otros elementos de fijación. En otro ejemplo, tal como se muestra esquemáticamente en la Fig. 4, el conector de entrada 105 es una extensión continua de la entrada de fluido 103, sin un elemento de fijación separado, por ejemplo, formándose como una sola pieza mediante moldeo u otras técnicas de formación de materiales. Las Figs. 3 y 4 muestran un segundo conector 115 configurado para formar una conexión de sellado con una fuente de muestra 201, como un recipiente o bolsa 201 que contiene líquido amniótico. El segundo conector 115 puede comprender una conexión de ajuste forzado liberable, una abrazadera, o una de sus combinaciones, u otros elementos de fijación liberables. La cámara 102, el filtro 101, la entrada de fluido 103, la salida de fluido 104 y el conector de entrada 105 pueden suministrarse como un kit en un empaque estéril, por ejemplo, como un kit desechable. Dicho kit, es decir, el aparato 100, proporciona así un proceso facilitado y mejorado de filtrado y obtención de células madre amnióticas. Por lo tanto, en uso, el líquido amniótico pasa el filtro 101 cuando fluye desde la entrada de fluido 103 a la salida de fluido 104. De este modo, las partículas se depositan en el filtro 101 y el líquido amniótico que contiene las células amnióticas fluye a través de la salida de líquido 104. Como se observa en el ejemplo de la Fig. 12, el filtro 101 puede estar conectado alrededor de su periferia 116 a la pared interior 113 de la cámara 102. Esto evita que el líquido amniótico pase de la entrada 103 a la salida 104 sin ser filtrado. El filtro 101 puede tensarse o sujetarse de otro modo para evitar que se pliegue o curve en la cámara 102. De este modo se mantiene un tamaño de malla o poro definido en toda la superficie del filtro 101 y, por tanto, unas características de filtrado definidas. El mantenimiento de un tamaño de malla o poro definido también reduce el riesgo de obstrucción del filtro 101. En consecuencia, se puede mejorar el rendimiento a largo plazo.

El aparato 100 puede comprender un conector de salida 106 para formar una conexión de sellado entre la salida y un dispositivo 202 de recepción de células amnióticas, como una centrifugadora u otro equipo de procesamiento de células amnióticas corriente abajo del aparato 100. La Fig. 4 muestra un ejemplo esquemático de dicho dispositivo 202. Esto minimiza la exposición a contaminantes y permite una manipulación aséptica eficaz del líquido amniótico en las etapas de procesamiento posteriores al filtrado. La Fig. 3 muestra un ejemplo en el que el conector de salida 106 comprende un tubo 106 conectado a la salida de fluido 104 en una primera conexión de sellado 117. El conector de salida 106 puede formar una conexión de sellado con la salida de fluido 104 mediante una conexión de ajuste forzado, un adhesivo, una abrazadera u otros elementos de fijación. En otro ejemplo, tal como se muestra esquemáticamente en la Fig. 4, el conector de salida 106 es una extensión continua de la salida de fluido 104, sin un elemento de fijación separado, por ejemplo, formándose como una sola pieza mediante moldeo u otras técnicas de formación de materiales. Las Figs. 3 y 4 muestran un segundo conector 118 configurado para formar una conexión de sellado con un dispositivo de procesamiento de células amnióticas corriente abajo del aparato 100, tal como una centrifugadora 202. El segundo conector 118 puede comprender una conexión de ajuste forzado, una abrazadera, una de sus combinaciones u otros elementos de fijación liberables. De este modo, la conexión entre el segundo conector 118 y, por ejemplo, una centrifugadora 202 puede conectarse y desconectarse repetidamente, y también puede volver a sellarse para mantener una conexión estanca en dicho procedimiento. La cámara 102, el filtro 101, la entrada de fluido 103, la salida de fluido 104, el conector de entrada 105 y el conector de salida 106 pueden suministrarse como un kit en un empaque estéril, por ejemplo, como un kit desechable. Dicho kit, es decir, el aparato 100, proporciona así un proceso facilitado y mejorado de filtrado y procesamiento de células madre amnióticas. El aparato 100 puede comprender una bomba 122, 123, dispuesta para presurizar el líquido amniótico para que fluya desde la entrada de líquido 103 hasta la salida de líquido 104. De este modo se consigue un filtrado más eficaz del líquido amniótico. Los volúmenes más grandes pueden filtrarse en menos tiempo.

La Fig. 6 muestra un ejemplo en el que una bomba 122 está conectada a la salida de fluido 104 para extraer fluido amniótico a través del filtro 101 en la dirección de las flechas indicadas. La bomba 122 puede estar dispuesta en la entrada de fluido 103 para empujar el líquido amniótico a través del filtro 101. La bomba 122 puede ser una bomba compacta de accionamiento manual integrada con la entrada de fluido 103, la salida de fluido 104, el conector de entrada 105 o el conector de salida 106.

La Fig. 7 muestra otro ejemplo, descrito con más detalle a continuación, en el que una bomba 123 está dispuesta para presurizar el líquido amniótico para que fluya desde la entrada de líquido 103 hasta la salida de líquido 104. La cámara 102 puede comprender un conducto 119 dispuesto entre la entrada de fluido 103 y la salida de fluido 104. La presión en la cámara 102 puede ser variable en respuesta a la comunicación fluida y/o gaseosa a través del conducto 119. De este modo, el flujo de líquido amniótico a través del filtro 101 puede optimizarse dependiendo de la aplicación, por

ejemplo, el caudal a través del filtro 101 puede aumentarse o disminuirse variando la presión en la cámara 102 a través del conducto 119.

La Fig. 5 muestra un ejemplo en el que un conducto 119 está en comunicación con la cámara 102. Un puerto de acceso 120, como un conector o elemento de válvula, puede ser accionado para permitir que un fluido o gas sea expulsado de la cámara 102, y/o inyectado en la cámara 102, para afectar la presión en la misma. El conducto 119 está dispuesto entre la salida de fluido 103 y el filtro 101 en la Fig. 5, pero el conducto 119 puede estar dispuesto entre la entrada de fluido 103 y el filtro 101 en otro ejemplo. La Fig. 5, como se describe a continuación, muestra otro ejemplo de un conducto 119 en comunicación con la cámara 102. Puede disponerse una bomba 123 en comunicación con el conducto 119, como se ejemplifica en la Fig. 7. Esto facilita la optimización del flujo en la cámara 102 y el proceso de filtrado asociado. En el ejemplo de la Fig. 7 el conducto 119 está en comunicación variable con una cavidad corriente arriba 108 de la cámara 102 y una cavidad corriente abajo 109 de la cámara 102, es decir, el filtro 101 puede estar dispuesto para dividir la cámara 102 en una cavidad corriente arriba 108 y una cavidad corriente abajo 109. En la Fig. 7, el conducto 119 está conectado tanto a la cavidad corriente arriba 108 como a la cavidad corriente abajo 109. La bomba 123 está dispuesta para presurizar el líquido amniótico para que fluya desde la cavidad corriente arriba 108 a la cavidad corriente abajo 109, o para que fluya desde la cavidad corriente abajo 109 a la cavidad corriente arriba 108. Este último caso puede ser ventajoso en una situación en la que se desee un flujo inverso momentáneo, por ejemplo, para eliminar un atasco u oclusión del filtro 101. En tal caso, las válvulas 120, 120', 121, 121', como se indica esquemáticamente en la Fig. 7, se accionan para proporcionar las direcciones de flujo deseadas. Por ejemplo, para un flujo inverso, las válvulas 120 y 121' pueden estar abiertas y las válvulas 120' y 121 pueden estar cerradas. Las válvulas 121, 121', pueden estar abiertas y las válvulas 120, 120', pueden estar cerradas en un modo de filtrado normal. La cavidad 108 corriente arriba puede presurizarse abriendo también la válvula 120' en dicho modo de filtrado.

El filtro 101 puede comprender un primer elemento de filtro 101a y un segundo elemento de filtro 101b dispuestos entre el primer elemento de filtro 101a y la salida de fluido 104, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 8. El segundo elemento de filtro 101b puede tener un tamaño de malla o de poro menor que el tamaño de malla o de poro del primer elemento de filtro 101a. Esto permite filtrar eficazmente partículas de dimensiones gradualmente más pequeñas. De este modo se reduce el riesgo de oclusión del filtro. Esto permite un proceso de filtrado del líquido amniótico más fiable y robusto. También se proporciona un filtrado mejorado del líquido amniótico que contiene un mayor intervalo en el tamaño de las partículas. Además, se puede obtener una fracción mayor de las células madre del líquido amniótico, ya que las células madre no se pierden en los poros obstruidos. Aunque la Fig. 8 muestra dos elementos de filtros 101a, 101b, debe entenderse que cualquier pluralidad de elementos de filtros puede disponerse en secuencia en la cámara 102, con un tamaño de malla o poro gradualmente decreciente, en la dirección del flujo de fluido desde la entrada de fluido 103 hasta la salida de fluido 104, para un filtrado eficaz de partículas de dimensiones gradualmente decrecientes. Los primeros y segundos elementos de filtros 101a, 101b, pueden estar separados por una distancia (d) a lo largo de una dirección de flujo de líquido amniótico desde la entrada de líquido 103 hasta la salida de líquido 104, como se indica esquemáticamente en el ejemplo de la Fig. 8. El movimiento del líquido amniótico entre los primeros y segundos elementos de filtro 101a, 101b, que en algunos casos puede implicar un flujo turbio, puede permitir reducir aún más el riesgo de acumulación no deseada de partículas en los primeros y segundos elementos de filtro 101a, 101b.

El filtro 101 puede comprender una malla de un tamaño comprendido entre 20 y 2000 μm . En otro ejemplo, el filtro 101 comprende una malla con un tamaño de malla en el intervalo entre 100 y 500 μm . Esto permite una filtración especialmente eficaz de las partículas del líquido amniótico. Volviendo nuevamente a la Fig. 8, el primer elemento de filtro 101a puede comprender una malla con un tamaño de malla en el intervalo entre 500 y 1000 μm , y el segundo elemento de filtro 101b puede comprender una malla con un tamaño de malla en el intervalo entre 30 y 150 μm . De este modo, el primer elemento de filtro 101a puede eliminar los residuos más grandes, seguido de la eliminación de partículas más pequeñas con el segundo elemento de filtro 101b. Esto permite un filtrado especialmente eficaz de partículas de tamaño variable y un filtrado fiable de mayores volúmenes durante periodos de tiempo más largos, ya que el riesgo de obstrucción se minimiza aún más. Como se ha mencionado anteriormente, cualquier pluralidad de elementos de filtro puede disponerse en sucesión en la cámara 102.

La Fig. 9 muestra tres elementos de filtro 101a, 101b, 101c, dispuestos en la cámara 102. En algunos ejemplos, el elemento de filtro que tiene el tamaño de malla o de poro más pequeño, dispuesto más abajo en la cámara 102, como el elemento de filtro 101b de la Fig. 6 y el elemento de filtro 101c de la Fig. 9, puede tener un tamaño de malla o de poro dimensionado de forma que sólo pasen a través del filtro 101 células amnióticas individuales o grupos de células amnióticas menores de 10 células. El tamaño de malla o poro más pequeño en un ejemplo de este tipo puede ser de aproximadamente 30 μm . El filtro 101 puede comprender una malla como, por ejemplo, una malla de nailon. El filtro 101 puede comprender un material poroso con un tamaño de poro variable a través del filtro 101 en la dirección de flujo del líquido amniótico desde la entrada de líquido 103 hasta la salida de líquido 104. Es decir, los residuos de mayor tamaño se eliminan en la superficie del filtro 101 más cercana a la entrada 103, mientras que las partículas de menor tamaño se eliminan más profundamente en el filtro, a medida que el líquido amniótico fluye a través del filtro 101 en dirección a la salida 104 y el tamaño de los poros se hace más pequeño. Como se ha mencionado anteriormente, la cámara 102 puede comprender una cavidad 108 corriente arriba y una cavidad 109 corriente abajo. Las cavidades corriente arriba y corriente abajo 108, 109, pueden formarse como una pieza integrada para formar la cámara 102, por ejemplo, en un proceso de moldeo o mediante otras técnicas de conformación de materiales. Las cavidades corriente arriba y corriente abajo 108, 109, pueden formarse como unidades separadas que luego se

conectan entre sí para formar una conexión de sellado, por ejemplo, mediante un adhesivo o por soldadura. El filtro 101 puede fijarse simultánea o posteriormente con dicho proceso de soldadura o mediante el adhesivo mencionado.

Las cavidades corriente arriba y corriente abajo 108, 109, pueden conectarse entre sí de forma liberable en un elemento de conexión 110, para formar una conexión de sellado, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 9. Esto permite abrir la cámara 102, por ejemplo, para sustituir el filtro 101. Por lo tanto, el filtro 101 puede conectarse de forma segura a la cámara 102, por ejemplo, los elementos de filtro 101a, 101b, 101c, pueden conectarse de forma segura a la cámara 102 en la Fig. 7. Esto facilita la personalización para diferentes aplicaciones, ya que los elementos de filtro 101a, 101b, 101c, de diferente tamaño de poro o malla, o diferente número de tales elementos de filtro pueden montarse en la cámara 102.

El elemento de conexión 110 está configurado para formar una conexión de sellado de las cavidades 108, 109 corriente arriba y corriente abajo, y puede comprender una junta anular que se extiende alrededor de la periferia de las cavidades 108, 109 corriente arriba y corriente abajo. El filtro 101 puede comprender un cartucho de diferentes números de elementos de filtro 101a, 101b, 101c, con diferentes tamaños de poro que pueden adaptarse a la muestra particular de líquido amniótico. Por ejemplo, la evaluación de la turbidez del líquido amniótico y del grado de lechosidad (nivel de vérnix tanto en tamaño de partícula como en opacidad) puede ser un indicador del cartucho de filtro adecuado a utilizar. Una tabla adjunta con la que comparar la muestra de líquido amniótico puede indicar qué cartucho de filtro utilizar. La cavidad corriente arriba 108 y/o la cavidad corriente abajo 109 pueden tener forma de embudo. Las Figs. 3-9 muestran ejemplos en los que tanto las cavidades corriente arriba como corriente abajo 108, 109, tienen forma de embudo. La Fig. 11 muestra un ejemplo en el que sólo la cavidad corriente abajo 109 tiene forma de embudo. Una forma de embudo puede ser ventajosa para dirigir el flujo de líquido amniótico a lo largo de un vector de simetría deseado a través del filtro 101 y del aparato 100. La cavidad corriente arriba 108 y/o la cavidad corriente abajo 109 pueden comprender una pared de cámara 111a, 111b dispuesta esencialmente en paralelo con el filtro 101, es decir, perpendicular a la dirección del flujo del líquido amniótico desde la entrada de líquido 103 hasta la salida de líquido 104. La Fig. 10 muestra un ejemplo en el que las paredes de la cámara 111a, 111b, de las cavidades anterior y posterior 108, 109 están dispuestas esencialmente en paralelo con el filtro 101. Esto minimiza el espacio dentro de la cámara 102, manteniendo al mismo tiempo una superficie de filtrado adecuada, para reducir al mínimo el riesgo de introducir, por ejemplo, aire que pueda perturbar las moléculas de tensioactivo, reducir el riesgo de infección y reducir la formación perjudicial de especies reactivas del oxígeno en las células amnióticas. La cámara 102, y/o el conector de entrada 105, y/o el conector de salida 106 pueden estar formados por un material de PVC libre de ftalatos. Esto proporciona un aparato que es adecuado para estar en contacto con materiales farmacéuticos de partida como las células amnióticas.

El aparato 100 puede comprender salientes 112 dispuestos para extenderse desde una pared interior 113 de la cámara 102. Las Figs. 11 y 12 muestran ejemplos de dichos salientes 112, en una vista lateral transversal y a través de la sección transversal A-A respectivamente. Las protuberancias 112 proporcionan soporte al filtro 101 en caso de que éste comience a doblarse y plegarse hacia la pared interior 113. Por lo tanto, en tal caso sigue siendo posible un flujo a través de la malla o los poros del filtro 101, ya que el filtro 101 puede estar soportado por las protuberancias 112 a una distancia de la pared interior 113, es decir, las protuberancias 112 permiten limitar aún más el riesgo de restricción del flujo y proporcionan un filtrado eficaz, sólido y fiable.

La Fig. 13 es un diagrama de flujo de un procedimiento 300 de filtrado de líquido amniótico que contiene partículas y células amnióticas. El procedimiento 300 comprende formar 301 una conexión de sellado entre una entrada de fluido 103 de una cámara 102 y una fuente de muestra de fluido amniótico 201. El procedimiento 300 comprende hacer pasar 302 el líquido amniótico a través de un filtro 101 encerrado en la cámara 102 proporcionando un flujo del líquido amniótico desde la entrada de fluido 103 a una salida de fluido 104 de la cámara 102. De este modo, las partículas se depositan en el filtro 101 y el líquido amniótico que contiene células amnióticas fluye a través de la salida 104. El procedimiento 300 proporciona así las ventajas descritas en relación con el aparato 100 y las Figs. 3-12 anteriores. El procedimiento 300 permite una filtración eficaz y estéril del líquido amniótico para obtener muestras de células amnióticas de alta calidad.

En una realización, la eliminación de materia particulada del TAF para obtener células de TAF purificadas puede realizarse aplicando cualquier procedimiento conocido en la técnica, como filtración, centrifugación, etc. El TAF puede filtrarse a través de un filtro con un tamaño de poro igual o superior a 20 μm . El filtro puede ser fabricado con cualquier material sintético, incluidos, pero sin limitación, acetato de celulosa, nitrato de celulosa (colodión), poliamida (nailon), policarbonato, polipropileno y politetrafluoroetileno (teflón). En una realización, la eliminación de materia particulada se realiza por la aplicación del aparato 100.

Selección de adherentes

A lo largo de la especificación se han utilizado y se utilizarán diversos términos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, el uso de los términos "expresar, expresión, y/o expresando" en el contexto de un marcador de superficie celular se comprende para indicar la presencia de un marcador particular en la superficie de una célula, habiendo sido producido dicho marcador de superficie por la célula. La expresión del marcador de superficie puede utilizarse para seleccionar entre diferentes poblaciones celulares, por ejemplo, la selección positiva de la expresión del marcador de superficie indica la selección de una población celular que expresa más fuertemente un marcador de superficie

particular en comparación con otra población celular. A la inversa, la selección negativa de la expresión del marcador de superficie celular indica la selección de una población celular que expresa más débilmente un marcador de superficie particular en comparación con otra población celular.

Como se ha explicado anteriormente y en otras partes de las especificaciones, el TAF contiene varios tipos de células progenitoras. En ciertos ejemplos, se pueden aislar y propagar determinados tipos de células progenitoras mediante la selección por adherencia. Por ejemplo, puede utilizarse un sustrato de vitronectina, Synthemax (Merck, CORNING®, Synthemax®, II-SC SUBSTRATE, CLS3535-1EA) como revestimiento para crear un entorno más *parecido al in vivo* para el cultivo de células madre, limitando así la maduración de las células progenitoras derivadas del TAF y manteniendo la plasticidad. Synthemax es un sustrato peptídico sintético, flexible y sin componentes animales a base de vitronectina para la expansión con o sin suero de células madre/progenitoras humanas y otros tipos de células madre adultas. Un experto en la técnica comprenderá que el sustrato peptídico basado en vitronectina puede incluir una porción de una proteína vitronectina, como una secuencia peptídica particular de vitronectina. Como alternativa, puede utilizarse la proteína vitronectina intacta. El sustrato de vitronectina Synthemax ofrece una alternativa sintética y libre de xenoquinas a los revestimientos biológicos y/o capas de células alimentadoras comúnmente utilizados en el cultivo celular y conocidos en la técnica. En pocas palabras, los matraces estándar tratados para cultivo de tejidos pueden revestirse con aproximadamente 0,2 ml de Synthemax/cm² a 10 µg/ml, lo que da una densidad superficial de 2 µg/cm², e incubarse a 37°C durante aproximadamente 1,5h, 2h, 4h, 8h, o más de 8h, o a temperatura ambiente durante aproximadamente 2h, 1h, 4h, 8h o más de 8h, retirándose y sustituyéndose opcionalmente la solución sobrante. En ciertos ejemplos, Synthemax puede revestirse con una densidad superficial de aprox.: 1 a 5 µg/cm², tal como 2 µg/cm², 1 a 10 µg/cm², 5 a 4 µg/cm², 1 a 3 µg/cm², o aproximadamente 1,5 a 2,5 µg/cm².

En otras realizaciones, la selección de la adherencia puede llevarse a cabo utilizando una superficie revestida con, por ejemplo, Colágeno, Fibronectina. Alternativamente, la selección de la adherencia puede realizarse utilizando una superficie no revestida comprendiendo un plástico tratado para el cultivo de tejidos.

Las células purificadas a partir del fluido TAF pueden resuspenderse suavemente en medios de cultivo celular precalentados libres de xeno, añadiéndose a continuación la suspensión celular a los matraces revestidos con Synthemax. Los medios pueden cambiarse en distintos momentos tras la adición a los matraces, por ejemplo, después de aproximadamente: de 2h a 168h, de 12h a 96h, de 24h a 72h, de 36h a 60h, de 42h a 56h, o 48h, y posteriormente se cambian aproximadamente: cada día, cada dos días, cada tres días, cada cinco días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas o aproximadamente menos de una vez cada dos semanas. Mediante la eliminación repetida del medio consumido, pueden eliminarse las células no adheridas, seleccionando así las MSC por su afinidad para adhesión a la superficie tratada con Synthemax. Las células pueden cultivarse durante un periodo de tiempo, como por ejemplo, 4d, 7d, 10d, 11d, 12d, 13d, 14d, 18d, 21d, 28d o más de 21d. Opcionalmente, en algunos ejemplos, las células pueden cultivarse en condiciones de hipoxia, el cebado por hipoxia puede alterar el metabolismo celular durante la expansión, aumentar la resistencia al estrés oxidativo y, por tanto, mejorar el injerto, la supervivencia en microambientes isquémicos y el potencial angiogénico de las MSC trasplantadas. Tras el cultivo, las colonias P0 (Unidades Formadoras de Colonias - UFC) que se hayan formado pueden disociarse y agruparse. Tras la agrupación, las células restantes pueden ser predominantemente MSC no específicas de un tejido. En ciertos ejemplos, las células P0 agrupadas pueden resuspenderse suavemente en medios de cultivo celular precalentados sin xeno y volverse a implantar en matraces tratados con cultivo tisular sin Synthemax para el pasaje. Las células agrupadas pueden sembrarse a una densidad de siembra de entre aprox.: 100 a 10000 células / cm², 500 a 8000 células / cm², 1000 a 5000 células / cm², o aproximadamente de 2000 a 4000 células / cm². Los medios pueden cambiarse aproximadamente cada 1d, 2d, 4d, o más de cuatro días. Después de un periodo de tiempo, tal como aproximadamente 2d, 4d, 7d, o más de 7d, las células pueden disociarse y cosecharse. El aislamiento selectivo adicional de las MSC puede lograrse como se describe a continuación.

Identificación de marcadores

Al comparar los perfiles de expresión genética de las TAF-MSC y las MSC de tipo adulto derivadas de tejido adiposo o médula ósea mediante ARNseq, las TAF-MSC tienden a expresar más de algunos genes presentes en las MSC de tipo adulto y menos de otros. La identificación de marcadores de superficie celular neonatal específicos de TAF-MSC, tanto positivos como negativos, puede permitir separar las MSC con calidad neonatal de las que se han diferenciado más y tienen menos importancia como células progenitoras utilizando, por ejemplo, ligandos como anticuerpos y aptámeros u otras técnicas de selección.

Los marcadores de superficie celular que distinguen las células relevantes para el tejido de otras MSC pueden dilucidarse mediante un proceso bioinformático que utiliza un algoritmo de puntuación de especificidad tisular. En la Figura 14 se muestra un ejemplo de algoritmo de puntuación de especificidad tisular MSC. La especificidad tisular puede medirse como una combinación de dos componentes: una "similitud transcripcional tisular" también conocida como puntuación de similitud y un "programa de expresión génica específico del tejido" también conocido como puntuación del conjunto de genes. En ciertos ejemplos, la puntuación de similitud puede ser una correlación Spearman Promedio con cada muestra de referencia de tejido MSC (por ejemplo, una muestra MSC de pulmón fetal). En algunos ejemplos, la puntuación del conjunto de genes puede ser la expresión promedio de los genes de un conjunto de genes específico de un tejido. Como se muestra en la Figura 14, en ciertos ejemplos, después de normalizar las puntuaciones de similitud y de conjunto de genes utilizando una transformación Z para convertir los valores de entrada, que es una

secuencia de números reales o complejos, en una representación compleja de dominio de frecuencia, y después combinarlos asignando el mismo peso a cada puntuación y transformando los valores combinados utilizando una transformación Z, la salida resultante es una puntuación de especificidad tisular MSC. La puntuación de especificidad tisular MSC mide la especificidad tisular relativa entre las muestras de entrada midiendo cuántas desviaciones estándar es una muestra más o menos específica para un tejido determinado en comparación con la muestra de entrada promedio. Por ejemplo, una puntuación de especificidad tisular MSC puede indicar en qué medida una muestra clonal parece tener un fenotipo específico de tejido, como un fenotipo pulmonar, en comparación con un clon promedio. Este enfoque permite identificar las puntuaciones del percentil X% superior mediante una función de distribución normal, es decir, el X% superior de clones que son más específicos del tejido en cuestión.

En un ejemplo, para un tejido dado, los clones priorizados por tejido pueden definirse como cualquier clon perteneciente a la puntuación percentil X% superior, en el que X es cualquier porcentaje dentro de un intervalo que tiene un extremo inferior de aproximadamente 0,1 a 25, como aproximadamente 1, 5, 10, 15 y 20, y un extremo superior de aproximadamente 30 a 75, como aproximadamente: 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70. En la Figura 15 se muestra un ejemplo de los resultados de la priorización de la especificidad tisular de TAF-MSC, en la que son visibles los umbrales del 15% y el 5%. Una vez priorizados los clones específicos de tejido, pueden identificarse los genes marcadores de superficie candidatos. Para cada tejido, pueden definirse dos grupos: -priorizado por tejido y tejido-distal. Se puede utilizar un programa de análisis adecuado para realizar esta determinación, por ejemplo DEseq2 de Bioconductor.org. El grupo de priorizado por tejido puede incluir clones con una puntuación en el percentil 15% superior. El grupo tejido-distal puede incluir clones en el percentil inferior Y% en el que Y es cualquier porcentaje dentro del intervalo que tiene un extremo inferior de aproximadamente 25 a 70, tal como aproximadamente: 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o 65 y un extremo superior de 75 a 99,9, tal como aprox.: 80, 85, 90, 95 o 99. La figura 16 muestra un ejemplo de este tipo de análisis en tejido renal. A continuación, se pueden identificar los genes expresados diferencialmente entre los grupos de priorizado por tejido y los de tejido-distal. Por último, los resultados de la expresión diferencial pueden anotarse con información sobre genes marcadores de superficie.

En ciertos ejemplos, para identificar marcadores de superficie celular específicos de tejido, los genes marcadores de superficie con un aumento de más de Z veces, en el que Z es al menos aproximadamente: 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces o incluso más veces de aumento en la expresión (log2FoldChange) en clones priorizados en comparación con un clon promedio y un Transcripts Per Kilobase Million (TPM) de más de aproximadamente 500, tal como más de aproximadamente: 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000 o incluso superiores pueden seleccionarse para obtener los mejores candidatos a marcadores específicos de tejido, como aproximadamente los mejores: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100 o más, por ejemplo como los que se muestran a continuación en las Tablas 3-6 y que se describen con más detalle a continuación. Los valores adecuados de log2FoldChange y TPM pueden variar aún más en función de las especificidades del tipo de tejido de acuerdo con la abundancia/ausencia de buenos marcadores.

Selección basada en marcadores

El líquido amniótico contiene células heterogéneas en un líquido homogéneo. De ahí que pueda ser necesaria una selección basada en marcadores. Un ejemplo de selección basada en marcadores es el uso de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). La clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) puede utilizarse para purificar la población celular de TAF-MSC, FACS permite una pureza muy alta de la población celular deseada, incluso cuando el tipo celular diana expresa niveles muy bajos de marcadores de identificación y/o se necesita una separación basada en diferencias en la densidad de marcadores. FACS permite la purificación de células individuales en función de su tamaño, granularidad y fluorescencia. Como comprenderá un experto en la técnica, FACS puede utilizarse para seleccionar determinadas poblaciones celulares que expresan un marcador de superficie celular más que otra población celular y viceversa. En algunos ejemplos de procedimientos de purificación, los procedimientos de purificación a granel, como el paneo, la depleción del complemento y la separación por microesferas magnéticas, pueden utilizarse en combinación con FACS o como alternativa a FACS. En resumen, para purificar células de interés mediante FACS, primero se tiñen con anticuerpos monoclonales (mAbs) marcados con fluorescencia, que reconocen marcadores de superficie específicos en la población celular deseada. La selección negativa de células no teñidas también puede permitir la separación. Para la producción GMP de células de acuerdo con algunos ejemplos, FACS puede ejecutarse utilizando una tecnología de clasificación de sistema cerrado como MACSQuant® Tyto®. Las muestras pueden conservarse libres de contaminación dentro del cartucho desechable MACSQuant Tyto, totalmente cerrado. Además, el aire filtrado puede conducir las células a través de un microcanal hasta el microchip a muy baja presión (< 3 PSI). Sin embargo, antes de ingresar en el microcanal, los posibles agregados celulares pueden ser retenidos por un sistema de filtrado que garantiza un proceso de clasificación sin problemas. El sistema de detección de fluorescencia puede detectar células de interés con base en parámetros de fluorescencia predeterminados de las células. Con base en sus firmas de luz fluorescente y dispersa, las células diana pueden ser redirigidas por una válvula de clasificación situada dentro del microcanal. Para ciertos ejemplos de procedimientos de purificación, el éxito de la tinción y, por tanto, de la clasificación puede depender en gran medida de la selección de los marcadores de identificación y de la elección del mAb. Los parámetros de clasificación pueden ajustarse en función de los requisitos de pureza y rendimiento. A diferencia de los clasificadores de gotas convencionales, las células clasificadas por el MACSQuant Tyto no pueden experimentar una presión o carga elevadas, y no pueden descomprimirse. Por lo tanto, un enfoque de clasificación tan suave puede dar lugar a una alta viabilidad y funcionalidad de las células. Alternativamente, otras técnicas de selección basadas en marcadores pueden ser conocidas por el experto y

empleadas en la presente memoria. Entre ellas se incluyen, pero sin limitación, la clasificación celular activada por magnetismo, la clasificación basada en microfluidos, la clasificación celular activada por flotabilidad, la citometría de masas, etc.

Células específicas de tejido y su uso

5 Marcadores de células TAF pulmonares

Como se ha explicado anteriormente, el análisis de los datos de ARNseq de clones de TAF-MSC, material de referencia de MSC adultas y neonatales, así como fibroblastos fetales y conjuntos de datos de expresión disponibles públicamente pueden utilizarse para identificar y caracterizar las células TAF-MSC. Por ejemplo, pueden establecerse subpoblaciones de TAF-MSC agrupando sus datos de expresión (ARNseq) con muestras de referencia neonatales. Dichas subpoblaciones incluyen, pero sin limitación, las MSC de pulmón, las MSC del tracto urinario (descritas también como MSC de riñón en la presente divulgación) y las MSC de piel. Las listas de genes de alta y baja expresión para cada grupo de datos de expresión pueden permitir la identificación de genes creadores de superficie para cada grupo. Mediante esta comparación de datos, se compararon subpoblaciones de células TAF con células MSC adultas en función de sus expresiones génicas (ARNseq), lo que dio como resultado una lista de genes marcadores de superficie específicos de neonatos para cada grupo. Se identificaron varios marcadores de superficie de interés asociados a las células TAF pulmonares. Por ejemplo, a continuación se proporciona una lista no exclusiva de marcadores de superficie preferentes utilizados para identificar y separar las células TAF pulmonares. Además, como el número de diferentes subtipos de MSC en el TAF es limitado, la selección de las MSC específicas de tejido puede realizarse en primer lugar mediante la caracterización y, a continuación, mediante una selección/clasificación negativa escalonada del material teniendo en cuenta el perfil combinado (multivariante) de marcadores de superficie de las diferentes MSC específicas de tejido. Un experto en la técnica comprenderá que cualquier combinación de estos marcadores de superficie puede utilizarse para identificar y aislar células TAF pulmonares de la población general de células derivadas de TAF y/o células TAF-MSC. En algunos ejemplos, la siguiente lista no exclusiva de marcadores de superficie puede expresarse en mayor medida en la superficie de las células Pulmonares-TAF en comparación con otros tipos celulares, como otras células derivadas de TAF y/o células TAF-MSC.

Como se explicó anteriormente, pueden utilizarse técnicas bioinformáticas para identificar marcadores de superficie específicos de tejido, por lo tanto, los marcadores de superficie identificados en la Tabla 1 pueden tener al menos un aumento de 10 veces en la expresión en clones priorizados en comparación con el clon TAF-MSC promedio (opcionalmente con umbral TPM > 2000).

1. **PCDH19** - protocadherina 19;
2. **DDR1** - receptor tirosina cinasa 1 con dominio de discoidina;
3. **MME** - metalloendopeptidasa de membrana;
4. **IFITM10** - proteína transmembrana 10 inducida por interferón;
5. **BGN** - biglycan;
6. **NOTCH3** - Receptor Notch 3;
7. **SULF1** - sulfatasa 1;
8. **TNFSF18** - Miembro 18 de la superfamilia TNF;
9. **BDKRB1** - receptor B1 de la bradicinina;
10. **FLT1** - tirosina quinasa 1 relacionada con fms;
11. **PDGFRA** - receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas;
12. **TNFSF4** - Miembro 4 de la superfamilia TNF;
13. **UNC5B** - Receptor B de netrina unc-5;
14. **FAP** - proteína de activación de fibroblastos alfa;
15. **CASP1** - caspasa 1;
16. **CD248** - Endosialina;
17. **DDR2** - receptor tirosina cinasa 2 con dominio de discoidina;
18. **PCDH18** - protocadherina 18; y/o

19. **CRLF1** - receptor de citoquinas tipo factor 1;**Tabla 1**

En contraste con los marcadores de superficie anteriores que pueden expresarse más fuertemente en la superficie de las TAF MSC de pulmón, en ciertos ejemplos, los marcadores de superficie siguientes pueden expresarse más débilmente en las TAF MSC de pulmón en comparación con otros tipos celulares, como otras células derivadas de TAF y/o TAF-MSC: CD24, ITGB4, TNFSF10, GFRA1, CD74, FGFR4, HAVCR1 y OSCAR. Como comprenderá un experto en la técnica, pueden utilizarse uno, dos, tres, cuatro o más de los marcadores de superficie de expresión más débil antes mencionados para separar las células TAF pulmonares de otros tipos celulares, como otras células derivadas de TAF y/o TAF-MSC.

Se utiliza al menos el marcador de superficie celular CD248 (Endosialina) para clasificar las TAF MSC pulmonares de una población de TAF MSC. Otros marcadores de superficie que pueden utilizarse para separar las TAF MSC de pulmón son DDR-1 (receptor tirosina quinasa 1 con dominio de discoidina) y LRRC38 (proteína 38 con repeticiones ricas en leucina), los tres identificados mediante anticuerpos como marcadores útiles para la separación. En algunos ejemplos, la endosialina, y DDR-1 y/o LRRC38, solos o en combinación con otros marcadores pueden utilizarse para clasificación. La endosialina puede combinarse con DDR-1 o LRRC38 para clasificación.

Como comprenderá un experto en la técnica, pueden utilizarse combinaciones adecuadas de los marcadores enumerados en la Tabla 1 y CD248, DDR-1 y LRRC38 para separar las TAF MSC de pulmón de las TAF MSC seleccionando marcadores específicos de la Tabla 1 o combinaciones de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más marcadores de la Tabla 1 y CD248, y/o DDR-1 y/o LRRC38. En ciertos ejemplos, las TAF MSC de pulmón pueden identificarse más específicamente identificando una combinación de expresión más fuerte, tal como una expresión 10 veces o más fuerte (opcionalmente con umbral TPM > 2000) de cualquier combinación de los marcadores anteriores con CD248, por ejemplo, PCDH19 y/o DDR1 y/o MME y/o IFITM10 y/o BGN y/o NOTCH3 y/o DDR-1 y/o LRRC38 en comparación con las TAF MSC. Cuando se utilizan combinaciones de marcadores, la identificación puede lograrse con un umbral más bajo de expresión más fuerte, como 4 veces o más, 6 veces o más, u 8 veces o más de expresión de cada uno de los marcadores.

En contraste con los marcadores de superficie anteriores que pueden expresarse más fuertemente en la superficie de las TAF MSC de pulmón (marcadores positivos) en comparación con las TAF MSC, en ciertos ejemplos, los marcadores de superficie siguientes pueden expresarse más débilmente en las TAF MSC de pulmón en comparación con otros tipos celulares (marcadores negativos), como una expresión de 1/8 veces o menos (opcionalmente con TPM>500) de cualquier combinación de los marcadores anteriores en comparación con las TAF MSC: CD24, ITGB4, TNFSF10, GFRA1, CD74, FGFR4, HAVCR1 y OSCAR. Cuando se utilizan combinaciones de marcadores negativos, la identificación puede lograrse con un umbral inferior de expresión más débil, como 1/2 veces o menos, 1/4 veces o menos, o 1/6 veces o menos de expresión de cada uno de los marcadores.

También se pueden utilizar combinaciones de dos o más de estos marcadores negativos para aislar más específicamente las TAF MSC de pulmón. Además, los expertos en la técnica también reconocerán que las combinaciones que incluyen marcadores tanto negativos como positivos, como en cualquiera de los umbrales descritos anteriormente, también pueden ser eficaces para aislar más específicamente las TAF MSC de pulmón.

Las Figuras 17A-17D muestran un ejemplo de los resultados de un estudio de prueba de principio sobre el uso potencial de TAF MSC pulmonares para tratamiento, realizado utilizando TAF MSC clasificadas neonatalmente que expresan marcadores de superficie de células pulmonares MSC incluyendo CD248, DDR1 y LRRC38 (denominadas "células LBX-THX-001"). El objetivo del estudio era investigar los efectos de las células LBX-THX-001 en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratas macho. Se probaron dos concentraciones de células (2 M células/kg y 5 M células/kg) y dos tipos de vehículos para las células (PBS y CryoStor CS-10).

El desarrollo de fibrosis en pulmón de rata tras la exposición a bleomicina está bien documentado en la literatura y es un modelo frecuentemente utilizado para estudiar la patología de la fibrosis pulmonar y también el efecto de diferentes tratamientos. El número de células LBX-THX-001 inyectadas se eligió para que fuera relevante para una posible terapia humana. Por lo tanto, el número de células se seleccionó de modo que reflejara los números de células utilizados en estudios anteriores en ratas (8-20 M células/kg) y seres humanos (0,5-2 M células/kg).

Se utilizó una instilación intratraqueal de bleomicina (1000 U/rata) a 34 ratas SD macho para inducir fibrosis pulmonar en las ratas. Durante la primera semana, las ratas fueron controladas y pesadas diariamente y, a partir de entonces, dos veces por semana hasta la finalización del estudio. En el día 4 tras la provocación con bleomicina, se administraron las células LBX-THX-001 mediante una inyección intravenosa (i.v.). El volumen de inyección fue de 194-535 µL (volumen de inyección máximo tolerado 1 ml/kg). La respuesta a la instilación intratraqueal de bleomicina fue la esperada con base a la experiencia previa para el modelo, con pérdida de peso durante los primeros días tras la instilación y posterior recuperación. No hubo diferencias significativas en la pérdida de peso entre el grupo de bleomicina y los grupos de tratamiento.

Como se muestra en las Figuras 17A-D, la instilación de bleomicina indujo un cambio fibrótico en el pulmón. La evaluación histopatológica concluyó cambios patológicos en el grupo de bleomicina tanto con respecto al porcentaje

de parénquima afectado como tras la puntuación mediante la escala de Ashcroft modificada. Como se muestra en las Figuras 17A-D, el grupo tratado con células LBX-THX-001 (2 millones de células/kg) 4 días después de la bleomicina mostró significativamente menos fibrosis en los pulmones en comparación con el grupo tratado con bleomicina. Esto se observó tanto en la evaluación histopatológica mediante la lectura "porcentaje de parénquima afectado" (Figuras 17A-B) como en la escala modificada de Ashcroft de puntuación de la fibrosis (Figuras 17A-D). No se detectaron MSC humanas en los pulmones de las ratas al finalizar el tratamiento (28 días después).

Todas las características desveladas en esta especificación (incluyendo cualquier prueba adjunta, reivindicaciones, resumen y dibujos), y/o todas las etapas de cualquier procedimiento o proceso así desvelado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de dichas características y/o etapas sean mutuamente excluyentes. La divulgación no se limita a los detalles de los ejemplos anteriores.

Los expertos en la técnica apreciarán que, en algunos ejemplos, las etapas reales dados en los procesos ilustrados o desvelados pueden diferir de los mostrados en las figuras. Dependiendo del ejemplo, algunas de las etapas descritas anteriormente pueden suprimirse, otras pueden añadirse. Por ejemplo, las etapas reales o el orden de las etapas dados en los procesos desvelados pueden diferir de los mostrados en la figura. Dependiendo del ejemplo, algunas de las etapas descritas anteriormente pueden suprimirse, otras pueden añadirse. Además, las características y atributos de los ejemplos específicos expuestos anteriormente pueden combinarse de diferentes maneras para formar ejemplos adicionales.

El lenguaje condicional, como "puede", o "podría", a menos que se indique específicamente lo contrario, o se entienda de otro modo dentro del contexto tal como se utiliza, generalmente pretende transmitir que ciertos ejemplos incluyen, mientras que otros ejemplos no incluyen, ciertas características, elementos o etapas. Por lo tanto, dicho lenguaje condicional no pretende implicar en general que las características, elementos o etapas sean de algún modo necesarios para uno o más ejemplos o que uno o más ejemplos incluyan necesariamente la lógica para decidir, con o sin entrada o indicación del usuario, si estas características, elementos o etapas están incluidos o deben realizarse en un ejemplo particular. Los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y similares son sinónimos y se utilizan de forma inclusiva y abierta, y no excluyen elementos, características, actos, operaciones, etc., adicionales. Además, el término "o" se utiliza en su sentido inclusivo (y no en su sentido exclusivo), de modo que cuando se utiliza, por ejemplo, para conectar una lista de elementos, el término "o" significa uno, algunos o todos los elementos de la lista. Asimismo, el término "y/o" en referencia a una lista de dos o más elementos, abarca todas las interpretaciones siguientes de la palabra: cualquiera de los elementos de la lista, todos los elementos de la lista y cualquier combinación de los elementos de la lista. Además, el término "cada", tal y como se utiliza en la presente memoria, además de tener su significado ordinario, puede significar cualquier subconjunto de un conjunto de elementos a los que se aplica el término "cada". Además, las palabras "en la presente memoria", "arriba", "abajo" y palabras de significado similar, cuando se utilizan en esta solicitud, se refieren a esta solicitud en su conjunto y no a porciones particulares de esta solicitud.

El lenguaje conjuntivo como la frase "al menos uno de X, Y y Z", a menos que se indique específicamente lo contrario, se comprende con el contexto como utilizado en general para transmitir que un elemento, término, etc. puede ser X, Y o Z.

El lenguaje de grado utilizado en la presente memoria, como los términos "aproximadamente", "alrededor de", "generalmente" y "sustancialmente", representan un valor, una cantidad o una característica cercana al valor, la cantidad o la característica indicados que aún realiza una función deseada o logra un resultado deseado. Por ejemplo, los términos "aproximadamente", "alrededor de", "generalmente" y "sustancialmente" pueden referirse a una cantidad que está dentro de menos del 10%, dentro de menos del 5%, dentro de menos del 1%, dentro de menos del 0,1% y dentro de menos del 0,01% de la cantidad indicada. Como otro ejemplo, en ciertos ejemplos, los términos "generalmente paralelo" y "sustancialmente paralelo" se refieren a un valor, cantidad o característica que se aparta de exactamente paralelo en menos o igual de 15 grados, 10 grados, 5 grados, 3 grados, 1 grado o 0,1 grado.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener células de líquido amniótico de término (células TAF) a partir de líquido amniótico de término, que comprende:
 - del líquido amniótico de término (TAF) proporcionado;
 - 5 eliminar la materia particulada del TAF para obtener células de TAF purificadas;
 - realizar la selección de adherencia en las células TAF purificadas para obtener células de adherencia TAF;
 - realizar un pasaje de las células de adherencia TAF para obtener una población de células comprendiendo las células TAF; y
 - 10 seleccionar las células TAF de la población como células que expresan al menos un marcador de superficie que es CD248.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que seleccionar células TAF comprende además seleccionar las células TAF de la población como células que expresan al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en PCDH19, DDR1, MME, IFITM10, BGN, NOTCH3, SULF1, TNFSF18, BDKRB1, FLT1, PDGFRA, TNFSF4, UNC5B, FAP, CASP1, DDR2, PCDH18, LRRC38 y CRLF1.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección comprende seleccionar células TAF que expresan además un marcador de superficie seleccionado del grupo de DDR1 y LRRC38.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de selección comprende seleccionar células TAF que expresan además DDR1 y LRRC38.
- 20 5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que seleccionar las células TAF comprende excluir las células que expresan un marcador seleccionado del grupo que consiste en CD24, ITGB4, TNFSF10, GFRA1, CD74, FGFR4, HAVCR1 y OSCAR.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que eliminar partículas comprende filtrar y centrifugar el TAF.
- 25 7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que realizar la selección de adherencia en las células TAF purificadas comprende adherir las células TAF purificadas a una superficie revestida con un sustrato basado en vitronectina.
8. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de selección se realiza mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).
9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de selección se realiza con anticuerpos dirigidos a cualquiera de los marcadores o marcadores de superficie.
- 30 10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de selección comprende seleccionar células TAF que expresan al menos dos marcadores, al menos tres marcadores o al menos cuatro marcadores de los marcadores de superficie de la reivindicación 2.
11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la etapa de selección comprende una pluralidad de etapas de clasificación, comprendiendo cada etapa de clasificación dirigir las células TAF a un primer grupo de salida o a un segundo grupo de salida en función de un conjunto de marcadores expresados o no expresados por las células TAF respectivas.
- 35 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la etapa de selección comprende:
 - 40 una primera etapa de clasificación para dirigir las células TAF que expresan al menos un marcador de superficie que es CD248 a un primer grupo de salida, y
 - una segunda etapa de clasificación para dirigir las células TAF del primer grupo de salida que expresan un segundo conjunto de marcadores a un segundo grupo de salida.

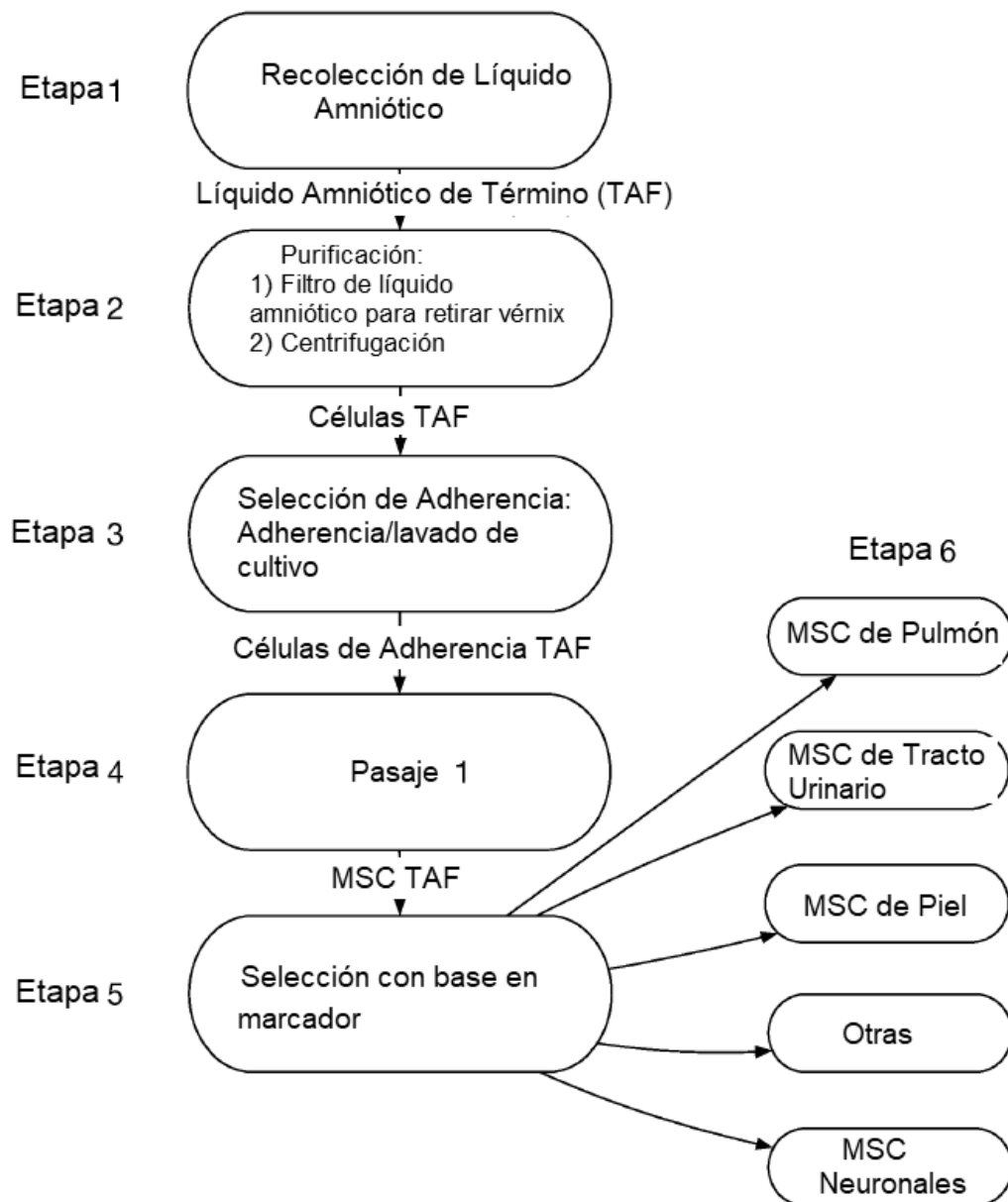


Fig. 1

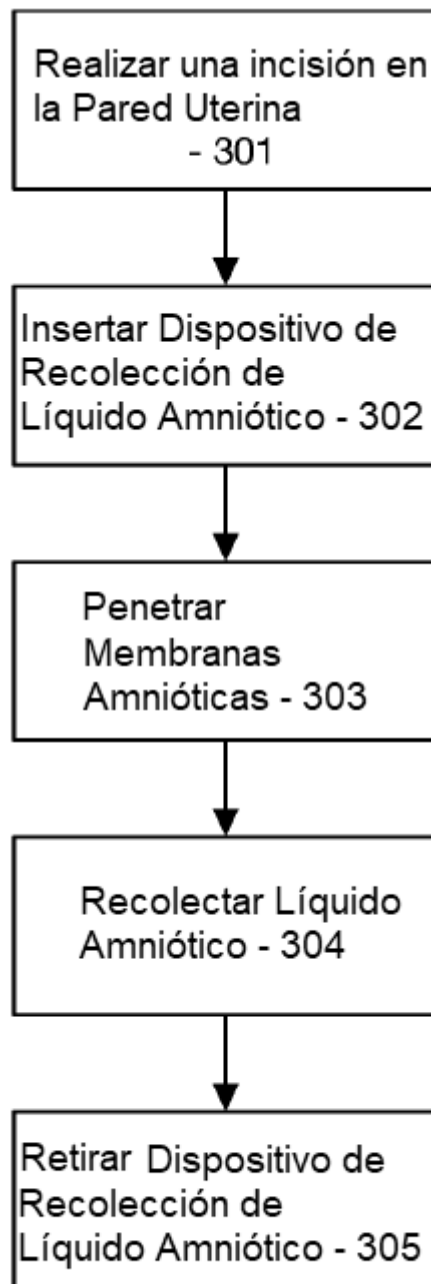


FIG. 2

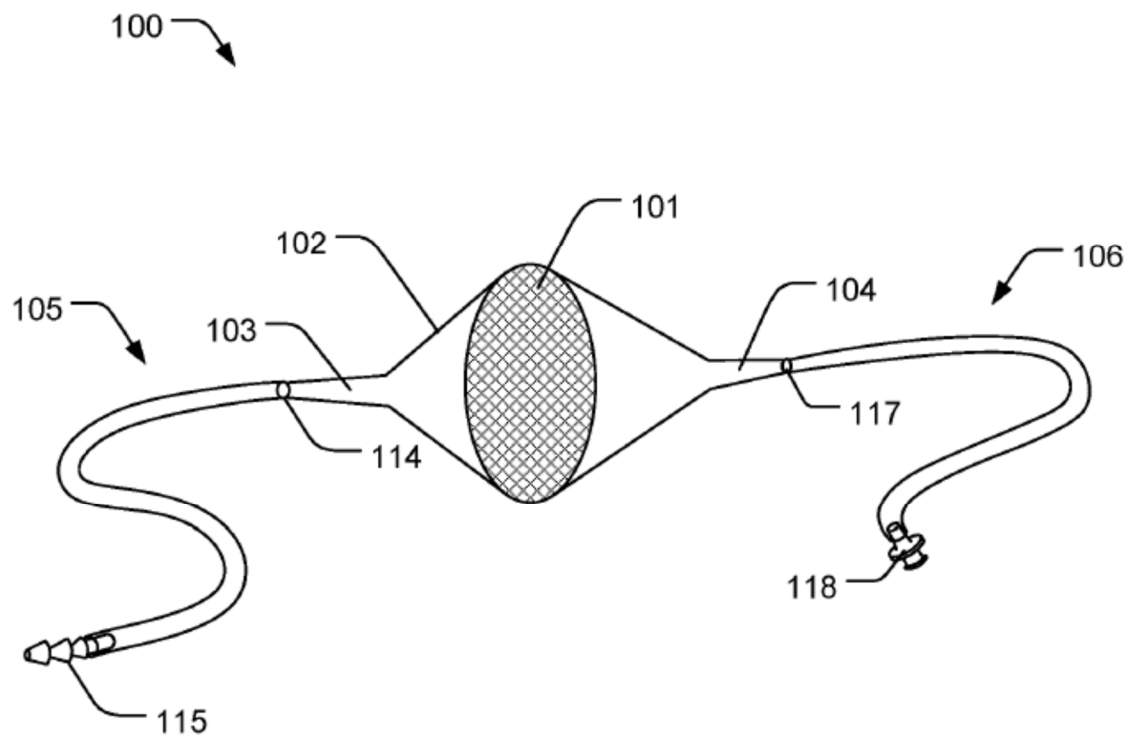


Fig. 3

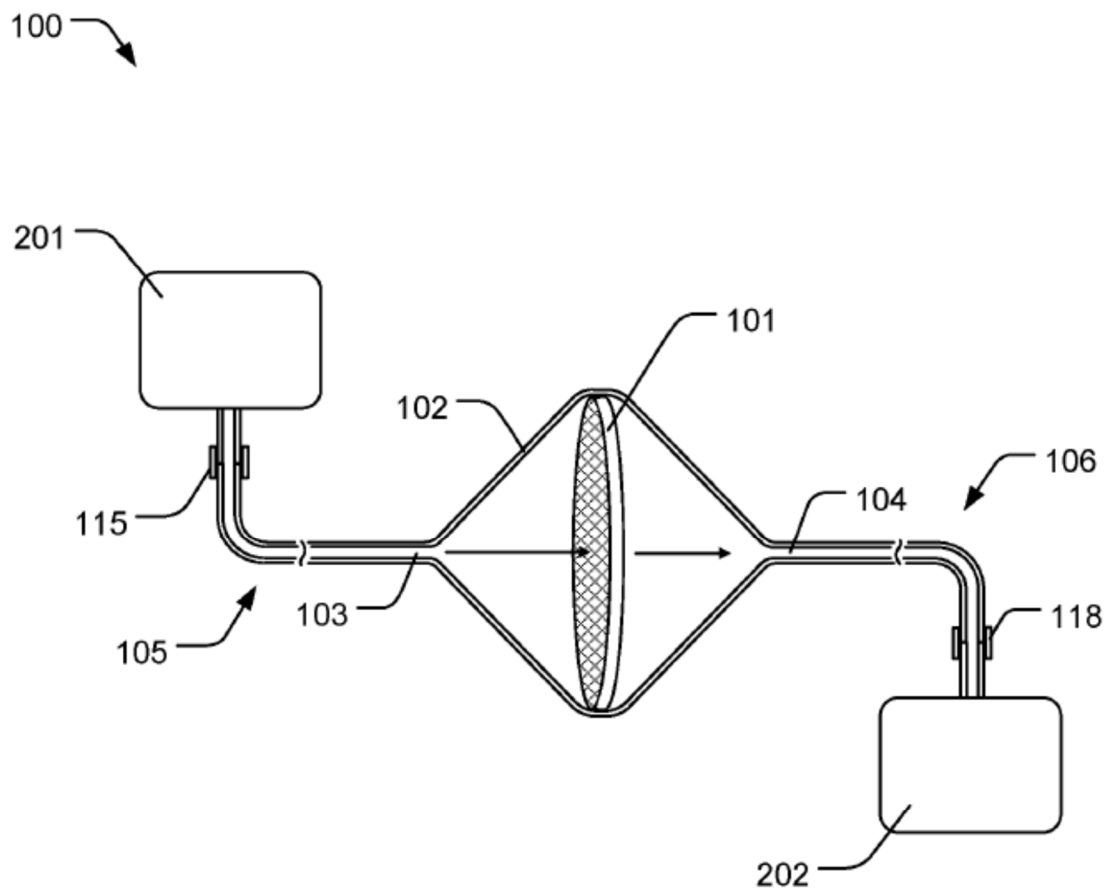


Fig. 4

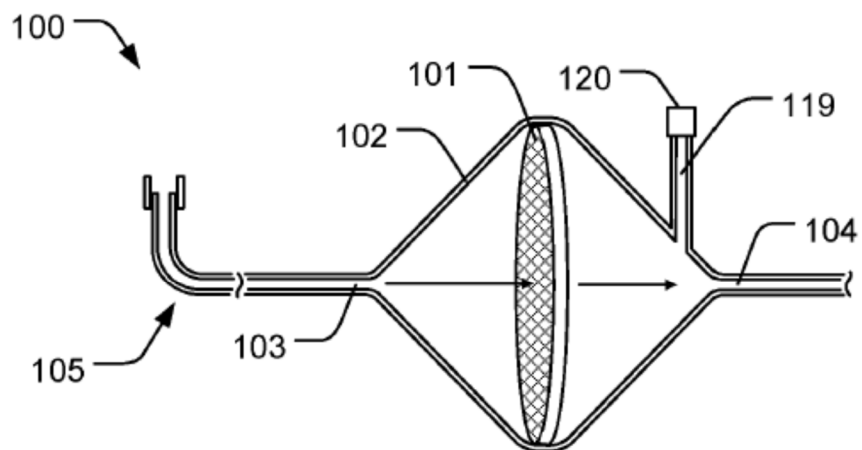


Fig. 5

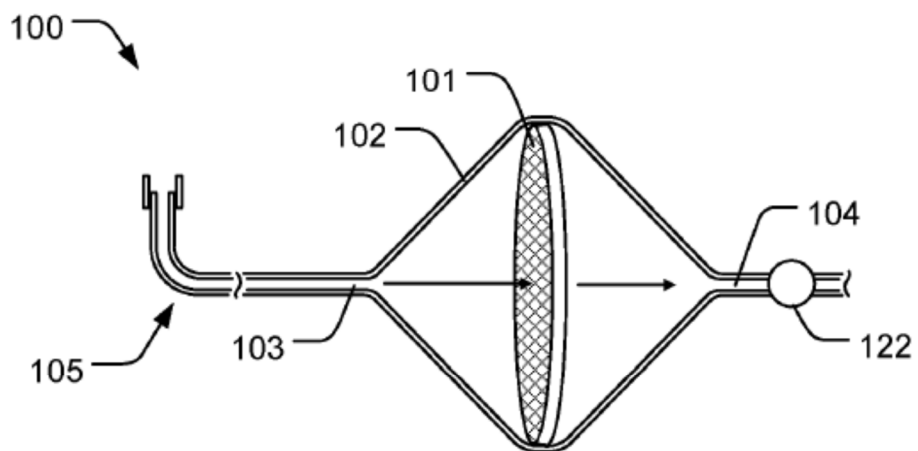


Fig. 6

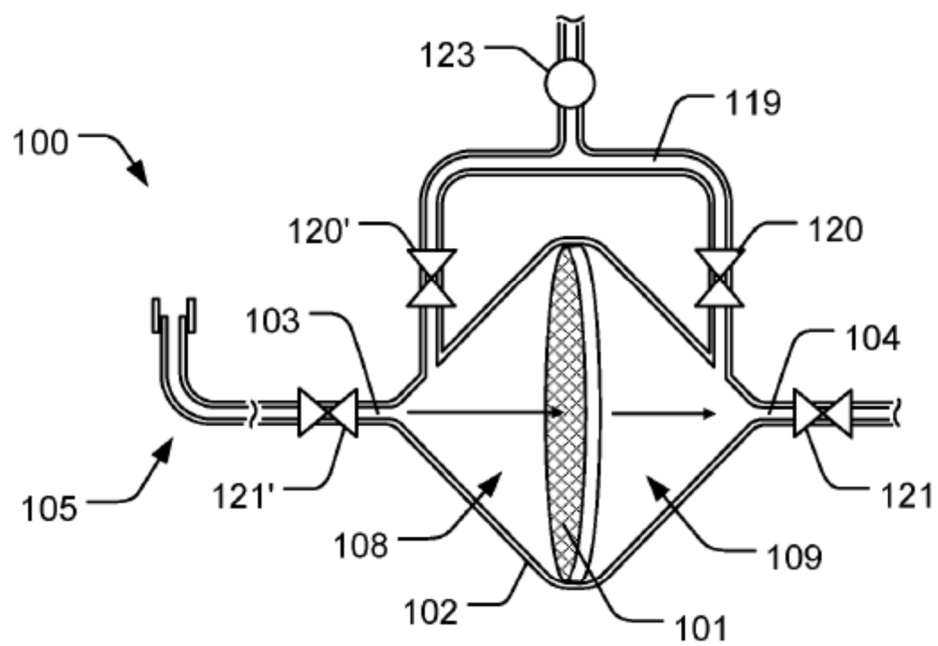


Fig. 7

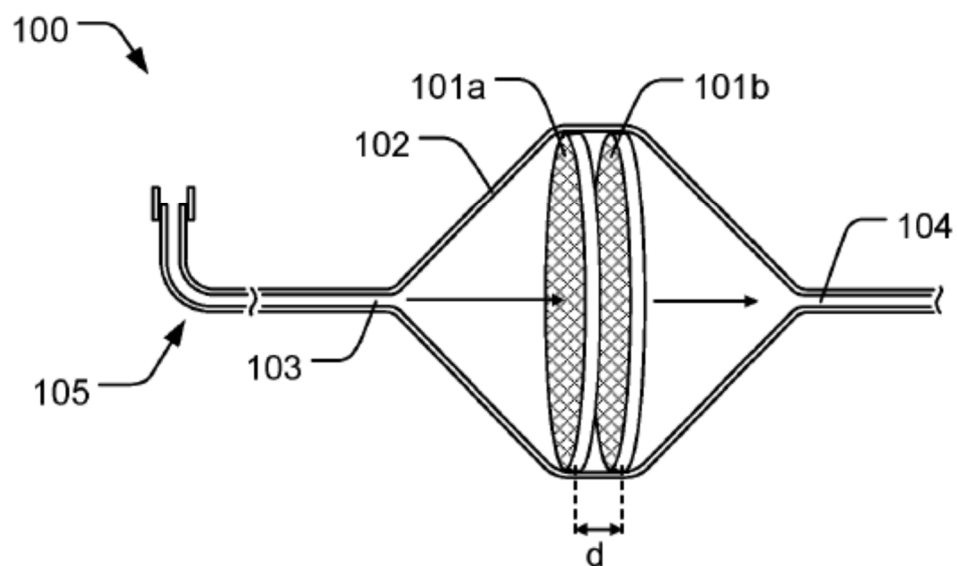


Fig. 8

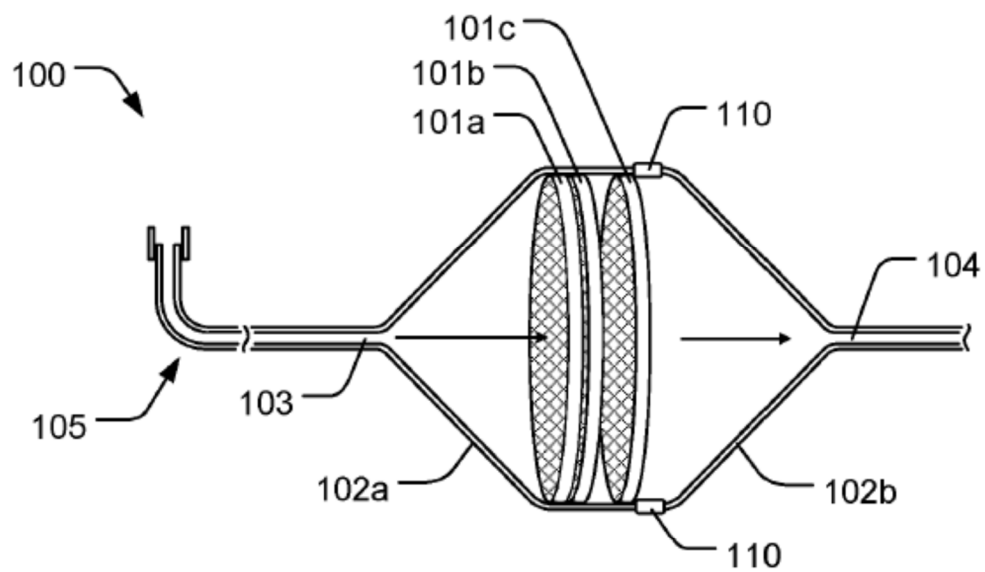


Fig. 9

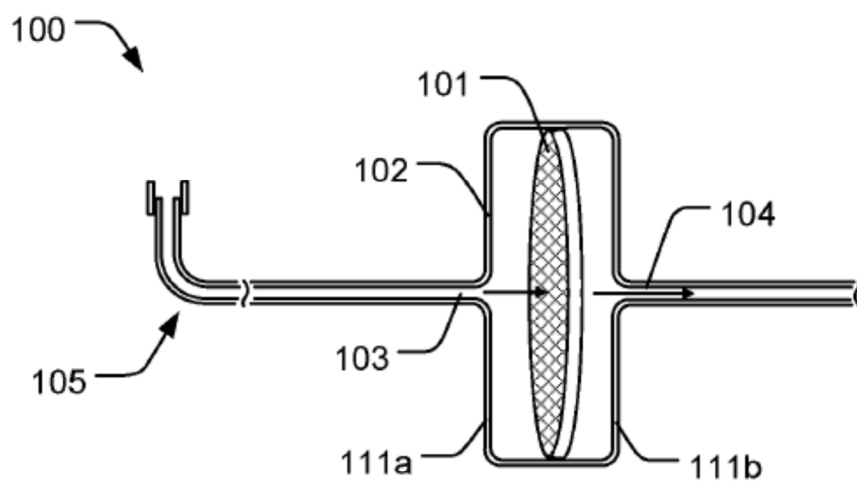


Fig. 10

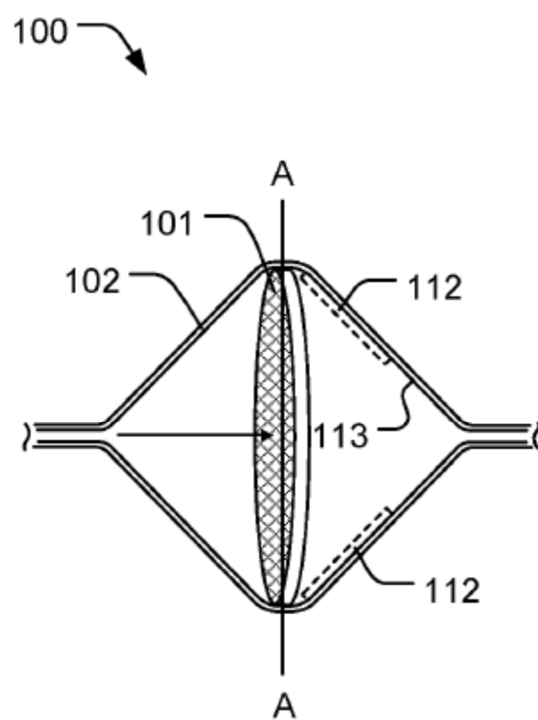


Fig. 11

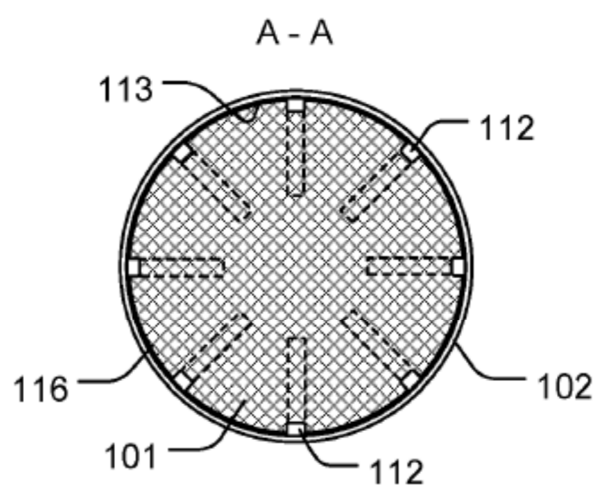


Fig. 12

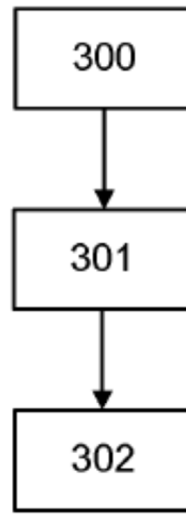
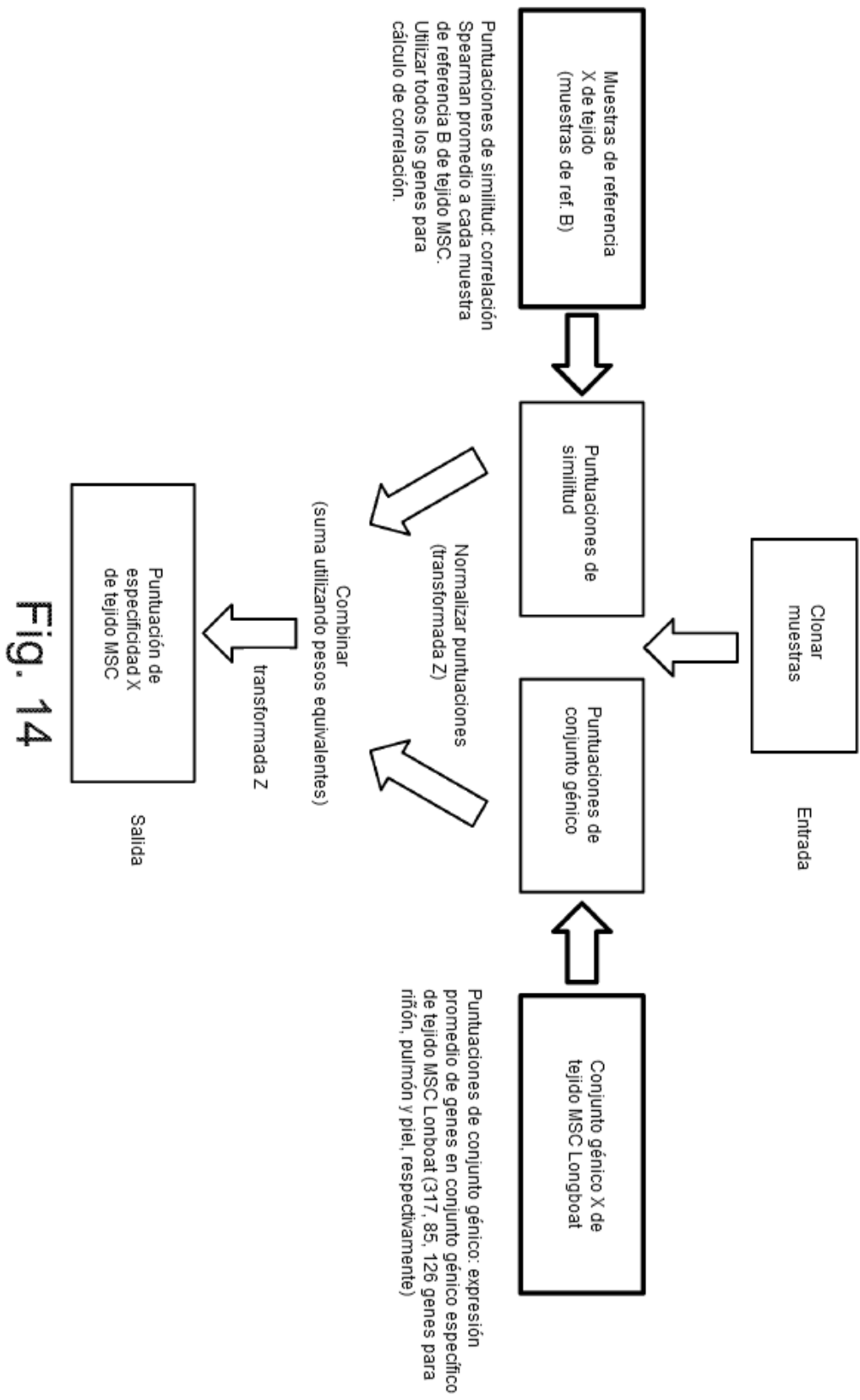
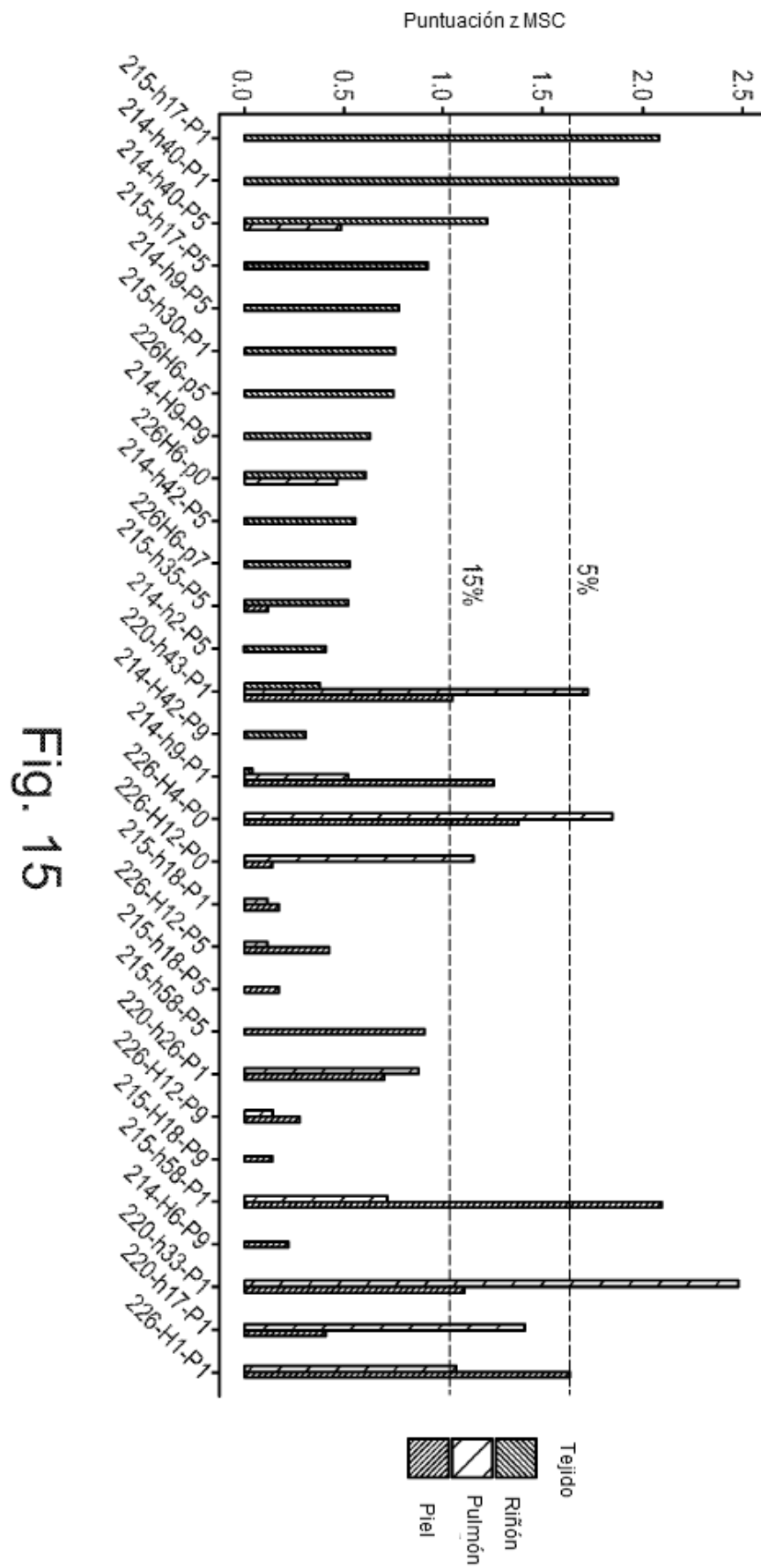


Fig. 13





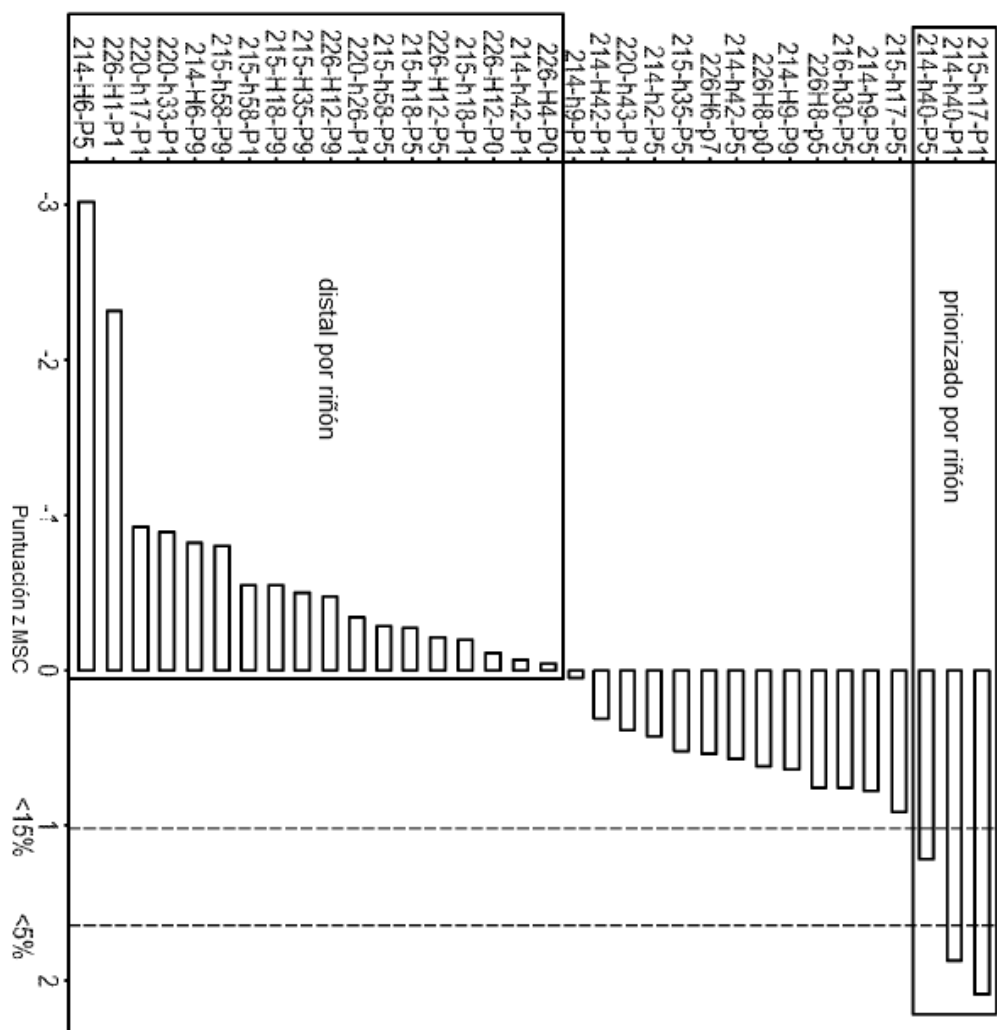


Fig. 16

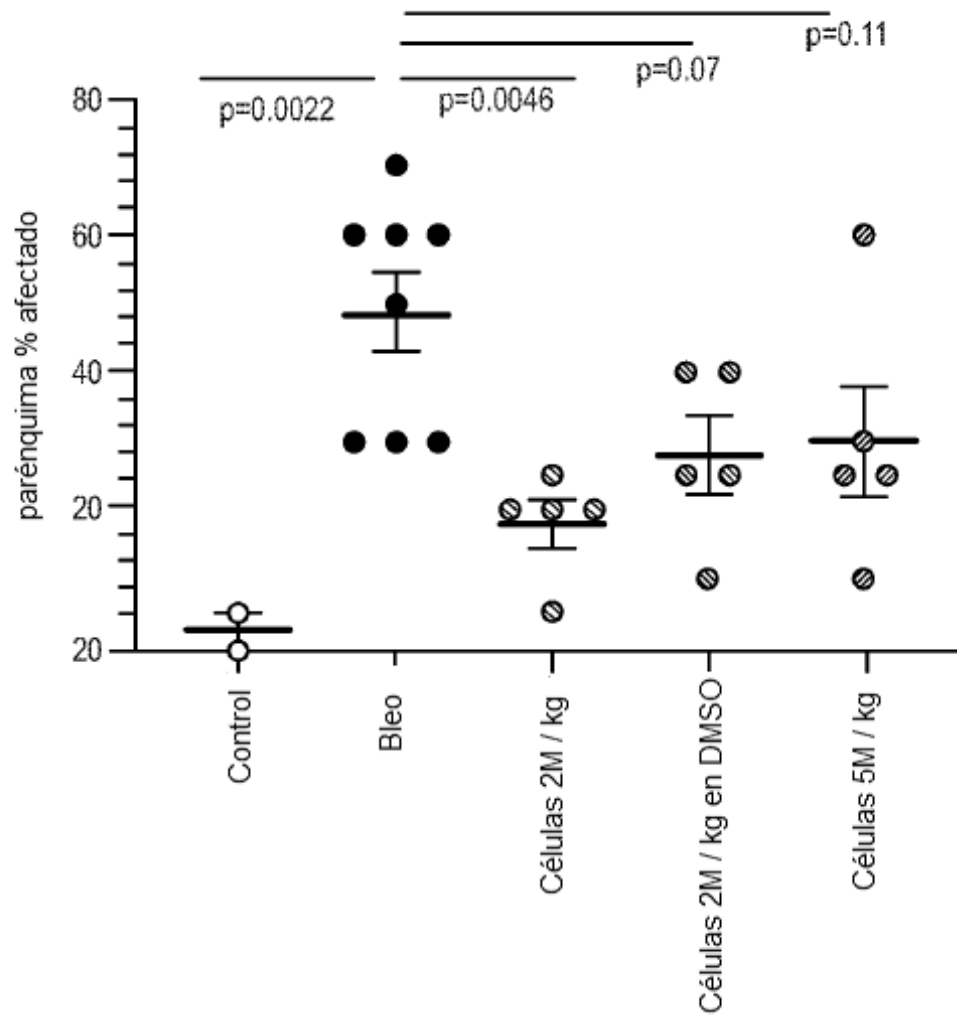


Fig. 17A

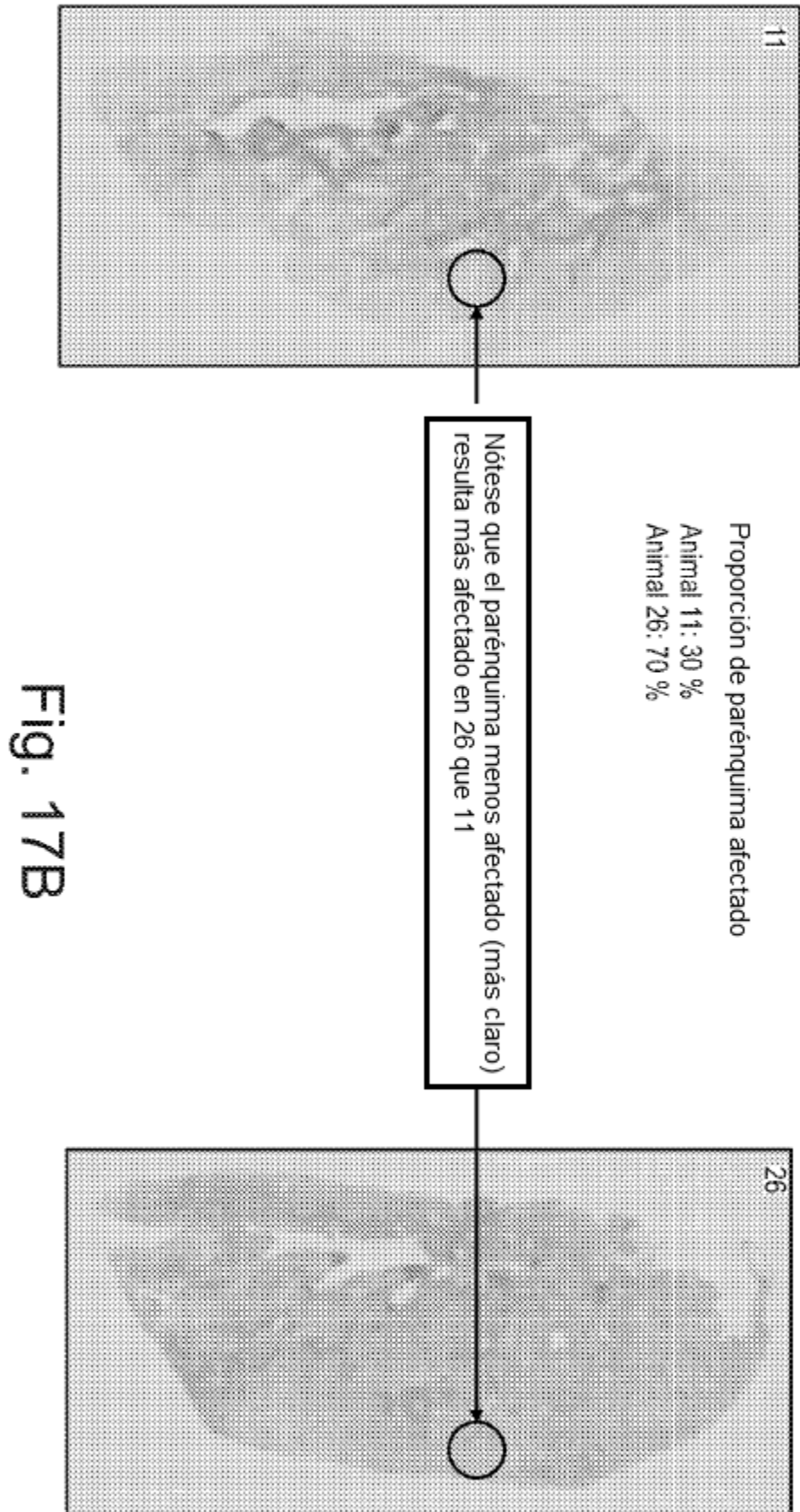


Fig. 17B

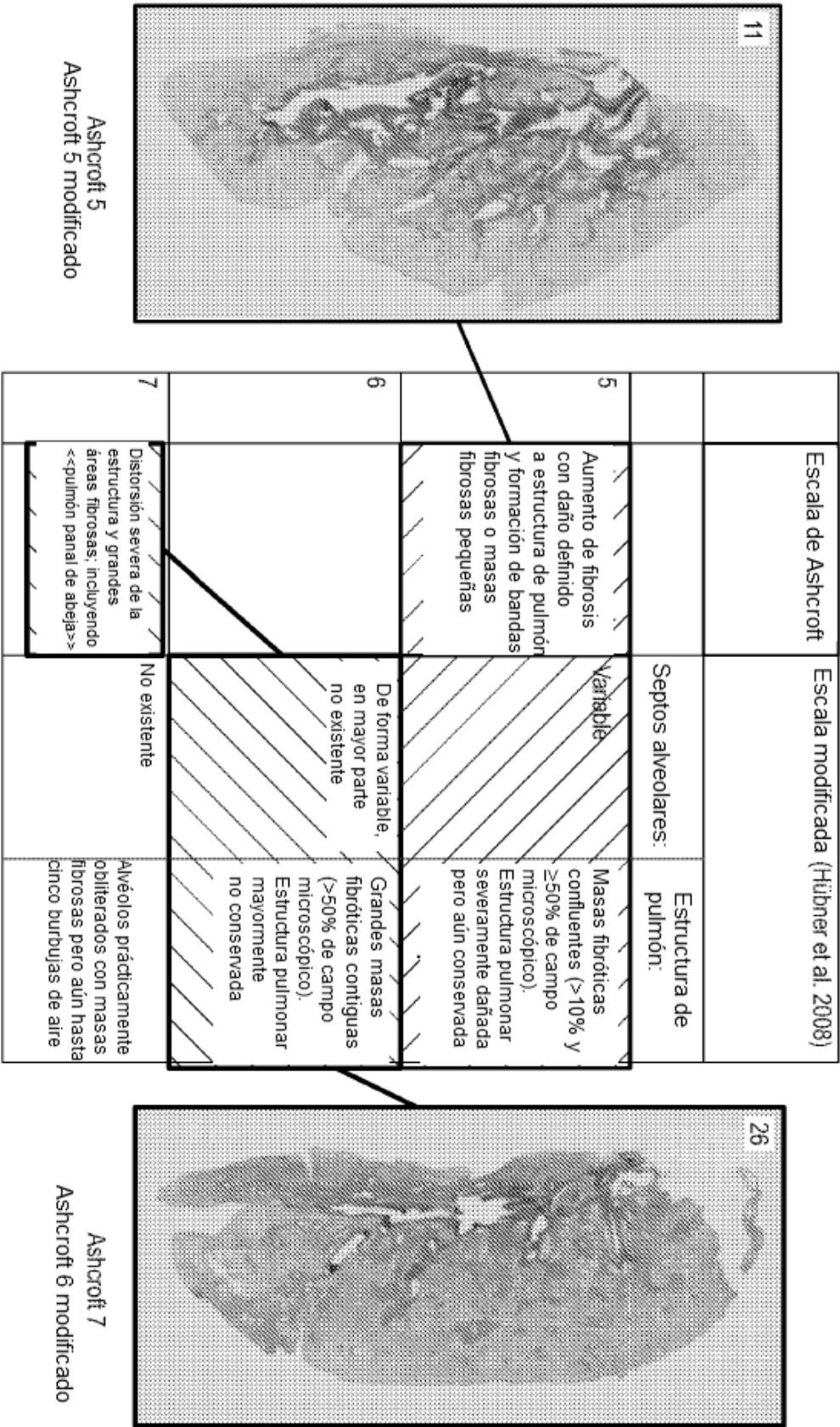


Fig. 17D