

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 827**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2018 PCT/IB2018/060503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2019 WO19123407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2018 E 18825797 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3728566**

54 Título: **Células estromales mesenquimales y procedimientos de obtención de células estromales mesenquimales a partir del cordón umbilical**

30 Prioridad:

22.12.2017 WO PCT/IB2017/058366

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

07.11.2024

73 Titular/es:

**CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Palermo, 26/A
43122 Parma, IT**

72 Inventor/es:

**ARDIGO', DIEGO;
MILAZZO, GIOVANNI;
DOMINICI, MASSIMO y
MURGIA, ALBA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 985 827 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

Células estromales mesenquimales y procedimientos de obtención de células estromales mesenquimales a partir del cordón umbilical

Introducción5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener células estromales, en particular células progenitoras estromales. Las células progenitoras estromales suelen ser capaces de dar lugar a hijas idénticas desde el punto de vista fenotípico y genotípico (autorrenovación), de este modo como al menos a otro tipo celular final. Algunas células estromales tienen capacidad de autorrenovación y en los últimos años se les ha prestado cada vez más atención. Las células estromales son células estromales mesenquimales no embrionarias. Se pueden obtener por aislamiento a partir del cordón umbilical por medio del procedimiento de la invención, que se describe en detalle en la presente memoria descriptiva.

Antecedentes de la invención

Las células estromales mesenquimales (CEM) son células estromales de especial interés para la comunidad científica, *entre otras cosas* por su multipotencia y baja inmunogenicidad (Pittenger et al., 1999, Science; vol. 284, p. 143-147). De acuerdo con el estado de la técnica, las células estromales mesenquimales (CEMs) se obtienen tradicionalmente de la médula ósea, pero también pueden aislarse de otras fuentes de mamíferos, tal como tejido adiposo, músculo, tejido conjuntivo, pulpa dental, sangre del cordón umbilical, placenta y líquido amniótico (Ludicone et al., 2014, J. Transl. Med., 12: 28). Entre las CEM, las CEM adultas derivadas de la médula ósea (MO-CEM) han sido las más estudiadas (por ejemplo, en el documento WO 2008/042174 A2). En la médula ósea, las CEMs coexisten con una variedad de tipos celulares que incluyen células madre más primitivas y de tipo embrionario, células madre mesenquimales, progenitores con compromiso de linaje, así como células maduras tales como osteoblastos y fibroblastos, y se han descrito diferentes procedimientos para el aislamiento de, por ejemplo, CEMs derivadas de la médula ósea (véase, por ejemplo, Majore, Cell Commun. Signal., 2009, vol. 20; 7:6). Bolomsky et al. (2014, Experimental Hematology, vol. 42, p. 516-525) describe los efectos de los fármacos inmunomoduladores talidomida y lenalidoma en la diferenciación de osteoblastos de células estromales de médula ósea humana, incluidos los efectos en la expresión de genes tal como el gen *APCDD1*. En el pasado también se han realizado algunos esfuerzos para explorar fuentes alternativas de células estromales mesenquimales. Por ejemplo, el cordón umbilical (CU) se propuso como reservorio adecuado de diferentes tipos celulares, algunos de los cuales demostraron tener propiedades similares a las células madre. El cordón umbilical es una estructura de los mamíferos placentarios que conecta la placenta con el feto en desarrollo, proporcionando de este modo una fuente de nutrición fetal. Está disponible después del nacimiento sin ningún procedimiento invasivo y preocupaciones éticas (Hass et al., 2011, Cell. Commun. Signal., vol. 9:12). El cordón umbilical está formado por la Jalea de Wharton, un tejido conjuntivo mucoso, gelatinoso y suelto, rico en células estromales, que debe su nombre al anatomista Thomas Wharton. La Jalea de Wharton comprende células dispersas en una sustancia amorfa compuesta de proteoglicanos, incluido el ácido hialurónico y diferentes tipos de glicanos (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/072273 A1). Generalmente se considera un tejido mesenquimal primitivo de derivación principalmente extraembrionaria (Weiss, 1983, Histology, cell and tissue biology, Nueva York, Elsevier Biomedical, p. 997-998), y se ha propuesto como fuente prometedora de CEMs (Wang et al., 2004, Stem Cells, vol. 22: p. 1330-1337).

Generalmente se reconoce que las células estromales del cordón umbilical (CU) son heterogéneas en cuanto a estructura, propiedades biológicas y localización dentro del CU. Se han descrito varios procedimientos para obtener células de la Jalea de Wharton (JW) de la CU, y se ha descrito que células con propiedades similares a las CEM residen y se originan en diferentes partes de la CU. El cordón umbilical humano consta de tres vasos, que normalmente se organizan en espiral hacia la izquierda (en sentido contrario a las agujas del reloj). Mitchell et al. (2003, Stem Cells, vol. 21, p. 50-60) describen un procedimiento en el que los vasos del cordón umbilical se eliminan antes de cosechar el tejido restante. A continuación, este tejido restante, que incluye tanto una fracción de la JW como del epitelio amniótico, se corta en dados y para producir pequeños fragmentos de tejido que se transfieren a placas de cultivo de tejidos; sin embargo, no está prevista la digestión enzimática del cordón umbilical o del tejido restante. Más bien, los fragmentos de tejido se utilizan posteriormente como explantes primarios a partir de los cuales las células migran fuera de las muestras de tejido al sustrato de cultivo. Otro informe (Romanov et al., 2003, Stem Cells, vol. 21, p. 105-110) indica que las CEMs similares a fibroblastos pueden aislarse de la vasculatura del cordón umbilical por medio de la digestión de la vena umbilical con colagenasa, que sin embargo produce una población mixta de células endoteliales vasculares y subendoteliales. El documento US 5.919.702 A (Purchio et al.) describe un procedimiento de aislamiento que consiste en abrir longitudinalmente un segmento de cordón de unos 2,5 cm de longitud, retirar los vasos sanguíneos y la cubierta y recoger la JW en un recipiente estéril, en el que se corta y se cultiva. Por ejemplo, se describe que las células pueden aislarse colocando una sección de 2-3 mm³ de la JW en un portaobjetos de vidrio en el fondo de una placa Petri, cubriéndola con otro portaobjetos y cultivándola durante 10-12 días para permitir que algunas células ("pre-condrocitos") migren fuera de la placa de cultivo. También se menciona la utilización de los pre-condrocitos para producir cartílago.

Davies et al. (Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol. 6, p. 1620-1630) es un artículo de revisión que describe la anatomía del cordón umbilical y los procedimientos para el aislamiento celular de la Jalea de Wharton. Subramanian et al. (2015, PLOS ONE, vol. 10(6), p. 1-25) compara las características de las células derivadas de los compartimentos amniótico, subamniótico, perivascular, Jalea de Wharton y mixto del cordón umbilical humano. Conconi et al. (2011, Open Tissue Engineer. Regen. Med. J., vol. 4, p. 6-20) compara la extracción, los procedimientos de cultivo y las características de las células del cordón umbilical humano obtenidas de la capa subendotelial de la vena umbilical, la zona perivascular, la Jalea de Wharton, el revestimiento del cordón umbilical y de todo el cordón umbilical. Ribeiro et al. (2013, International Review of Neurobiology, vol. 108, p. 79-120) describe protocolos para aislar células madre mesenquimales de la Jalea de Wharton del cordón umbilical humano. Kita et al. (2010, Stem Cells and Development, vol. 19(4), p. 491-501) caracteriza las células madre mesenquimales de la membrana de revestimiento del cordón umbilical obtenidas del subamnios de la membrana del cordón umbilical humano, por ejemplo, por medio de la expresión de marcadores de superficie.

También se ha informado del aislamiento de células derivadas de la matriz del cordón umbilical a partir de tejidos de origen animal. Por ejemplo, Lange-Consiglio et al., (2011, Open Tissue Engineer. Regen. Med. J., vol. 4, p. 120-133) informan del aislamiento de "células derivadas de la matriz del cordón umbilical" de zonas "intervasculares" y "perivasculares" del cordón umbilical de caballo.

El peso del cordón umbilical humano de aproximadamente 40 g a término (Raio et al., 1999, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., vol. 83; p. 131-135; Conconi et al., 2011, Open Tissue Engineer. Regen. Med. J., vol. 4, p. 6-20) supone un límite superior natural para el material de partida disponible para el aislamiento de células con propiedades similares a las CEM. De acuerdo con el documento US 2004/0136967 A1 y Seshareddy et al. (2008, Meth. Cell Biol., vol. 86, p. 101-119), es difícil obtener un número elevado de células deseadas del cordón umbilical. Por lo tanto, los autores recomiendan extraer un número relativamente elevado de células y describen las condiciones que se han optimizado para el aislamiento de un número relativamente elevado de células; por ejemplo, para permitir la extracción de un gran número de células. Proponen un tratamiento enzimático relativamente duro del cordón umbilical. Se describen diferentes zonas de la Jalea de Wharton, pero no se recomienda específicamente la exclusión de determinadas zonas de origen de las células para la extracción, como la zona perivascular, en consonancia con la recomendación general de utilizar un número elevado de células. Las células se cultivan después del aislamiento. Un enfoque alternativo se describe en los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al. (Stem Cells, 2005, 23:220-229); estas publicaciones describen el aislamiento de células con propiedades similares a las CEM exclusivamente a partir de la zona perivascular del cordón umbilical. Dado que esta zona está anatómicamente relativamente restringida, la cantidad de material de partida es relativamente baja, en comparación con los procedimientos de aislamiento que parten de todo el cordón umbilical. Además, en vista de la proximidad de los vasos sanguíneos, no puede excluirse la contaminación por células sanguíneas; por lo tanto, se describe la selección negativa contra la expresión de CD45 para evitar la contaminación con células no deseadas en el cultivo. También el documento WO 2017/058003 A1 describe procesos de aislamiento de CEMs a partir del cordón umbilical, la pulpa dental, el prepucio, la córnea u otras fuentes; el proceso de aislamiento de células estromales mesenquimales a partir del cordón umbilical se realiza preferentemente en condiciones estériles, y el cordón umbilical se somete preferentemente a tratamiento con colagenasa durante intervalos de tiempo relativamente largos. De acuerdo con Conconi et al., 2011, Open Tissue Engineer. Regen. Med. J., vol. 4, p. 6-20, aún no se han establecido los protocolos más adecuados para potenciar la expansión y el almacenamiento *in vitro* de las CEMs. Por lo tanto, sigue siendo necesario proporcionar poblaciones formadas por células que se caractericen por propiedades esencialmente uniformes y que sean capaces de expandirse de forma fiable *ex vivo*; y también se necesitan procedimientos fiables para proporcionarlas.

Problema a resolver

De este modo, un objeto de la presente invención incluye la eliminación de las desventajas asociadas con el estado de la técnica. Los objetos particulares comprenden la provisión de un procedimiento fiable para obtener una célula estromal mesenquimal (CEM), y de la provisión reproducible de células estromales mesenquimales (CEMs) y poblaciones de CEMs, con propiedades superiores de auto-renovación en buenos rendimientos. Se desea que las poblaciones sean relativamente uniformes y no contengan células no deseadas, tales como células apoptóticas, células de linaje hematopoyético, etc. de este modo, en otras palabras, se desea proporcionar células estromales mesenquimales por un procedimiento que sea ventajoso en términos de fiabilidad y/o rendimiento, con respecto a los procedimientos actualmente conocidos y practicados. Diversos inconvenientes del estado de la técnica definen otros objetivos de mejora abordados por los presentes inventores, objetivos a los que se ha llegado por medio de la contribución descrita y reivindicada en la presente memoria descriptiva.

Sumario de la invención

La presente invención se relaciona con un procedimiento *ex vivo* para la obtención de células estromales mesenquimales (CEMs). También se describen en la presente memoria descriptiva las células estromales mesenquimales (CEM) y otras descripciones relacionadas con las mismas. Los principales aspectos y realizaciones de la invención se suman a continuación.

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento *ex vivo* para obtener una célula estromal mesenquimal. El procedimiento comprende (a) aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma

a partir de un cordón umbilical, donde la Jalea de Wharton estromal es la Jalea de Wharton del cordón umbilical que excluye la zona perivascular, y (b) someter la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma a un tratamiento enzimático que comprende la enzima colagenasa en presencia de lisado de plaquetas (LP), liberando de este modo al menos una célula de la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma; en la que la etapa b) va seguida de una etapa c): (c) expandir dicha al menos una célula en un medio de crecimiento que comprenda lisado de plaquetas (LP). Preferentemente, la célula obtenida tras la etapa (b) es multipotente.

Además de las etapas (a) y (b), el procedimiento de la invención comprende al menos una etapa adicional. En particular, se trata de una etapa para aumentar el número de células comprendidas, aprovechando el potencial de división celular de las células obtenidas en la etapa (b). Preferentemente, la(s) célula(s) obtenida(s) tras la etapa (c) es(son) multipotente(s).

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que las células procedentes del estroma del cordón umbilical son particularmente ventajosas. Las ventajas incluyen la homogeneidad de las poblaciones celulares y propiedades similares a las de las células madre. En particular, en ausencia de vasos del cordón umbilical, se pueden conseguir estas ventajas. Por lo tanto, es preferente que la etapa (a) de aislamiento de la Jalea de Wharton estromal o de una fracción de la misma a partir del cordón umbilical se caracterice por una etapa de eliminación física de los vasos y de la zona perivascular del cordón umbilical. Los vasos y la zona perivascular pueden eliminarse antes de la etapa (a) o durante la etapa (a). Una forma técnicamente ventajosa de extraer los vasos y la zona perivascular, que es preferente en la presente invención, se caracteriza por despojar los vasos y la zona perivascular del cordón umbilical. Los inventores han observado que la extirpación de los vasos, por ejemplo tirando de ellos, también elimina la zona perivascular.

Además, los inventores han descubierto que es ventajoso segmentar el cordón umbilical antes de dicha etapa de eliminar físicamente los vasos y la zona perivascular. La segmentación suele realizarse por medios físicos, tal como unas tijeras o un bisturí. Preferentemente, la segmentación es perpendicular al cordón. Más preferentemente, los segmentos perpendiculares preferentemente tienen cada uno una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 cm, y más preferentemente de aproximadamente 2,5 cm. En una realización preferente, el segmento o segmentos de vasos se retiran del segmento o segmentos del cordón umbilical antes de la etapa (b). En particular, es preferente extraer los vasos, o más precisamente segmentos de vasos, tras la segmentación -preferentemente perpendicular- del cordón umbilical.

Los inventores también han descubierto que la cantidad de actividad de la colagenasa es importante. En una realización preferente, la colagenasa está presente durante la etapa de tratamiento enzimático (b) a una actividad específica relativamente baja, como se detalla más adelante.

En el procedimiento de la presente invención, es ventajoso un aislamiento rápido de las células estromales del cordón umbilical. En una realización preferente, las etapas (a) y (b) juntas se llevan a cabo en un tiempo total de menos de 6 horas, más preferentemente menos de 5 horas, más preferentemente menos de 4 horas y más preferentemente menos de 3 horas. Es evidente que una duración corta de las etapas (a) y (b) juntas también significa que la propia etapa (b) es corta. Generalmente, la brevedad de la etapa b), es decir, el aislamiento rápido, en particular la brevedad del tratamiento enzimático puede contribuir a que las condiciones durante la etapa b) sean suaves.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto además que la presencia de lisado de plaquetas durante la digestión enzimática es ventajosa. En primer lugar, los inventores descubrieron que la presencia de lisado de plaquetas humanas no inhibe ni disminuye ni bloquea la actividad enzimática de la enzima colagenasa, al menos no hasta un punto que interfiera negativamente en la liberación enzimática deseada de las células del tejido circundante, por ejemplo, de la matriz estromal. Se sabe que el plasma sanguíneo contiene numerosas proteasas, por lo que existía el prejuicio de añadir una proteína catalizadora (tal como la colagenasa) mientras el plasma sanguíneo o sus constituyentes estuvieran presentes, o *viceversa*, ya que cabría esperar que la proteína catalizadora (tal como la colagenasa) se degradara con el tiempo y disminuyera de este modo su actividad; sorprendentemente, los presentes inventores establecieron que la digestión con colagenasa funciona eficazmente incluso en presencia de lisado de plaquetas. En segundo lugar, los inventores descubrieron que las células obtenibles por digestión en presencia de lisado de plaquetas en el procedimiento de acuerdo con la presente invención tienen excelentes propiedades proliferativas (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 2B y 2C). De este modo, preferentemente, en la etapa (b) la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma se somete a tratamiento enzimático en presencia de lisado de plaquetas de mamífero (LP), más preferentemente lisado de plaquetas humanas (LPh).

Adicionalmente a eso, en la etapa (c) hay lisado de plaquetas. Preferentemente, en la etapa (c) el lisado de plaquetas (LP) es lisado de plaquetas humanas (LPh). Preferentemente, la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que no comprende ningún suero añadido, en particular ningún suero fetal bovino (SFB).

En una realización particularmente preferente, la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento particular específicamente apropiado para el procedimiento de la invención, opcionalmente con suplementos. Tal medio de crecimiento puede comprender un medio base químicamente definido y/o un lisado de plaquetas.

El procedimiento de la invención produce células con propiedades particulares, que también se describen en la presente memoria descriptiva. De este modo, es particularmente preferente que la célula obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la invención sea una célula como se describe en la presente memoria descriptiva, como sigue.

- 5 En la presente memoria descriptiva se describe una célula estromal mesenquimal (CEM). La CEM también puede denominarse "célula descrita en la presente memoria descriptiva" o simplemente "célula". La CEM descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza porque (a) expresa el gen APCDD1, y (b) no expresa el gen 3G5. Preferentemente, la célula es una célula aislada. Más preferentemente, la célula se deriva de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical. Preferentemente, la célula es una célula de primate. Por lo tanto, la célula no es
10 preferentemente de un caballo, es decir, no es una célula de caballo. Asimismo, es preferente que la célula no proceda de un roedor (por ejemplo, ratón o rata), es decir, que no sea una célula de roedor (por ejemplo, célula de ratón o célula de rata). Lo más preferente es que la célula sea humana.

Preferentemente, la célula es una célula humana derivada del estroma de la Jalea de Wharton y que expresa el gen APCDD1.

- 15 Preferentemente, la célula expresa además el gen PPAR γ . Aún De este modo, preferentemente no es mutuamente excluyente que la célula exprese además el gen FLVCR2. En el caso de una célula humana, es preferente que la célula humana exprese al menos uno, preferentemente al menos cualquier combinación de dos, y más preferentemente todos los antígenos leucocitarios humanos ALH-A, ALH-B y ALH-C. Además, en el caso de una célula humana, es preferente que la célula no muestre los antígenos leucocitarios humanos ALH-DP, y/o ALH-DQ.
20 Opcionalmente tampoco se muestra ALH-DR. Preferentemente, la célula no muestra ninguno de los antígenos leucocitarios humanos ALH-DP, ALH-DR y ALH-DQ. Alternativamente, ALH-DR se muestra en niveles bajos.

- La célula descrita en la presente memoria descriptiva es típicamente más pequeña que algunas CEMs que han sido aisladas por diversos procedimientos de acuerdo con el estado de la técnica. Por ejemplo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede tener un volumen menor y/o una superficie menor. Existen varios procedimientos
25 para determinar el volumen o la superficie celular, tal como la citometría de flujo para determinar el volumen celular de las células desprendidas, y la determinación de la superficie celular al microscopio para las células adherentes. Dichos procedimientos se describen a continuación.

- Preferentemente, la célula no muestra ninguna actividad telomerasa, y/o no expresa ninguna telomerasa. Preferentemente, la célula es multipotente. Más preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en varios tipos
30 celulares. Es particularmente preferente que la célula tenga al menos todos los potenciales de diferenciación siguientes: (a) adipogénico; (b) condrogénico; (c) osteogénico.

Preferentemente, la célula es una célula madre mesenquimal.

- La célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Las realizaciones preferentes del primer aspecto de la invención son combinables con
35 la célula descrita en la presente memoria descriptiva en todas y cada una de las combinaciones, a menos que el contexto indique lo contrario. Alternativamente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede describirse como una célula obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

- En la presente memoria descriptiva se describe también una población de células. La población comprende al menos una célula como se describe en la presente memoria descriptiva. Más preferentemente, la población celular comprende
40 una multitud de células, de las cuales al menos el 80 % (en número de células), preferentemente al menos el 90 % (en número de células), más preferentemente al menos el 95 %, como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % (cada una en número de células) son células como las descritas en la presente memoria descriptiva. Todas las descripciones preferentes de la célula descrita en la presente memoria descriptiva se aplican también a la población celular descrita en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, al menos el 70 %,
45 preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, como al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, más preferentemente el 100 %, del número total de células son células como las descritas en la presente memoria descriptiva, y opcionalmente una o más de sus formas preferentes, solas o en combinación. La población celular es positiva para la expresión del gen APCDD1.

Preferentemente, la población es una población aislada de células.

- 50 Preferentemente, la población celular se caracteriza además porque el volumen y/o la superficie de las células de la población celular es similar o, alternativamente, porque un alto porcentaje de las células tiene un volumen y/o una superficie pequeños, como se describe en detalle más adelante. El volumen se correlaciona normalmente con la luz dispersada hacia delante (LDHA) determinable por citometría de flujo.

- Preferentemente, la población celular se caracteriza además porque al menos el 70 % de las células (por número de células) o más son viables. Esto representa una ventaja significativa sobre la técnica anterior, en la que el porcentaje
55 de células viables es menor. Más preferentemente, al menos el 75 % de las células (por número de células) son

viabiles. Más preferentemente, al menos el 80 % de las células (por número de células) son viables. Preferentemente, la viabilidad se determina inmediatamente después del aislamiento de las células, es decir, antes de la expansión.

5 Preferentemente, la población celular no comprende ninguna célula perivascular. Un marcador de las células perivasculares es 3G5. Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador 3G5 y/o ninguna célula que muestre 3G5 en su superficie.

Preferentemente, la población celular no comprende ninguna célula epitelial. Un marcador de las células epiteliales es la molécula de adhesión de células epiteliales (MACEp). Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador MACEp y/o ninguna célula que muestre MACEp en su superficie.

10 Preferentemente, la población celular no comprende ninguna célula endotelial. Un marcador de las células endoteliales es el CD31. Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador CD31 y/o que muestre CD31 en su superficie.

Preferentemente, la población celular se obtiene por un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en particular cuando comprende la etapa (c), es decir, la etapa de expansión.

15 Alternativamente, la población celular descrita en la presente memoria descriptiva puede describirse como una población celular obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende la etapa (c).

Descripción detallada de la invención

20 La siguiente descripción detallada revela variantes específicas y/o preferentes de los rasgos individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferentes aquellas realizaciones, que se generan combinando dos o más de las variantes específicas y/o preferentes descritas para dos o más de los rasgos de la presente invención.

25 Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que la invención descrita en la presente memoria descriptiva es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Por lo tanto, será evidente para la persona de habilidad ordinaria en el arte que la presente divulgación incluye todas estas variaciones y modificaciones. La divulgación también incluye todas las entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones mencionados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más de dichas entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones. De este modo, a menos que se indique específicamente lo contrario en la presente memoria descriptiva o que el contexto requiera otra cosa, la referencia a una única entidad, compuesto, característica, etapa, procedimiento o composición se entenderá que abarca una y una pluralidad (es decir, más de una, como dos o más, tres o más o todas) de dichas entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones.

30 La presente divulgación no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria descriptiva, que se proporcionan a efectos ilustrativos y de ejemplificación. Entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones funcionalmente o de otro modo equivalentes están dentro del alcance de la presente divulgación.

35 Nada de lo expuesto en la presente memoria descriptiva debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a una enseñanza específica.

40 Este documento debe leerse con una mente dispuesta a comprender y con la mejor intención objetiva de encontrarle sentido técnico. Todos los términos utilizados en la presente memoria descriptiva deben entenderse en el sentido y con el alcance que normalmente tienen en la técnica correspondiente, a menos que, en casos particulares, este documento otorgue a una o más palabras un significado especial, por medio de definición explícita o de otro modo. En caso de que las definiciones contenidas en la presente memoria descriptiva difieran parcial o totalmente de las definiciones contenidas en parte o en la totalidad de la bibliografía, prevalecerán las definiciones contenidas en la presente memoria descriptiva.

45 A menos que se indique específicamente lo contrario o que el contexto requiera otra cosa, cada realización, aspecto y ejemplo desvelado en la presente memoria descriptiva se considerará aplicable a, y combinable con, cualquier otra realización, aspecto o ejemplo desvelado en la presente memoria descriptiva.

50 A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la materia (por ejemplo, en genética, biología molecular, expresión génica, biología celular, cultivo celular, células madre, células estromales, neonatología, medicina regenerativa, anatomía, histología, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica). Los libros de texto y los artículos de revisión publicados, por ejemplo, en inglés, suelen definir el significado tal y como lo entiende comúnmente una persona de habilidad ordinaria en la materia.

55

La expresión "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entenderá en el sentido de "X e Y" o "X o Y" y se considerará que proporciona una revelación explícita de "y", de "o" y de ambos significados ("y" u "o").

Tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, los términos "aproximadamente", "ca." y "sustancialmente" significan todos aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor numérico o intervalo establecido en la presente memoria descriptiva designa preferentemente +/- 10 %, más preferentemente +/- 5 %, en torno al valor numérico o intervalo recitado o reivindicado. Términos como "sustancialmente no", "sustancialmente ausente", etc., con referencia a un rasgo de una célula, significan que la característica respectiva no puede detectarse en una célula con procedimientos analíticos normalmente utilizados en el área respectiva de acuerdo con el estado de la técnica, y/o que sustancialmente todas las células de una población de este modo descrita no tienen la característica respectiva.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se utiliza en el contexto del presente documento para indicar que pueden estar presentes opcionalmente otros miembros además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término "que comprende" abarque la posibilidad de que no haya otros miembros presentes, es decir, a los efectos de esta realización, "que comprende" debe entenderse en el sentido de "que consiste en".

A menos que se especifique expresamente lo contrario, todas las indicaciones de cantidades relativas relativas a la presente invención se hacen en base peso/peso. Las indicaciones de cantidades relativas de un componente caracterizado por un término genérico se relacionan con la cantidad total de todas las variantes o miembros específicos cubiertos por dicho término genérico. Si se especifica que un determinado componente definido por un término genérico está presente en una determinada cantidad relativa, y si este componente se caracteriza además por ser una variante o miembro específico cubierto por el término genérico, se entiende que no hay otras variantes o miembros cubiertos por el término genérico presentes adicionalmente de forma que la cantidad relativa total de componentes cubiertos por el término genérico supere la cantidad relativa especificada; más preferentemente no hay otras variantes o miembros cubiertos por el término genérico presentes en absoluto.

El término "alogénico" se utiliza en la presente memoria descriptiva para describir cualquier cosa que se derive de un individuo diferente de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes de uno o más loci no son idénticos.

El término "área" o "área de superficie" o "área de superficie celular", con respecto a una célula, se relaciona con el área de superficie de la célula vista desde arriba. En el contexto de la presente divulgación, el área superficial bidimensional de una célula se determina mientras la célula está en cultivo adherente, es decir, la célula se adhiere a la placa de cultivo. Se considera ventajoso para la reproducibilidad de la determinación que las células se encuentren en un estado de baja confluencia porque se cree que a baja confluencia las células no se inhiben significativamente entre sí por inhibición de contacto. A continuación se indican los procedimientos para determinar la superficie.

Las expresiones "área superficial media" y "área media" se relacionan con la media de las áreas superficiales de dos o más células individuales, en las que en una primera etapa primero se determina el área de cada célula individual como se ha descrito anteriormente, y a continuación en una segunda etapa posterior se determina el área media como la media aritmética de las áreas de las células individuales, tal como se determinó en la primera etapa. Típicamente, al menos 35 células se someten a la primera y segunda etapa para la determinación del área media; en otras palabras, la media representa el promedio de al menos 35 células.

El término "autólogo" se utiliza en la presente memoria descriptiva para describir cualquier cosa que se derive del mismo individuo. Por ejemplo, "célula autóloga" se relaciona con una célula derivada del mismo individuo. El trasplante de células autólogas se considera a veces ventajoso porque supera la barrera inmunológica que, de otro modo, provocaría el rechazo.

Una célula es una entidad biológica compuesta de citoplasma encerrado dentro de una membrana. En la presente memoria descriptiva, el término "célula" se relaciona preferentemente con una célula eucariota. El término "célula" puede relacionarse con una célula madre o a una célula que carezca de propiedades de célula madre, tal como una célula terminalmente diferenciada o incluso una célula muerta. Típicamente, la célula es una célula procedente de un organismo pluricelular o de una parte del mismo. Preferentemente, la célula está aislada de dicho organismo multicelular, es decir, no está físicamente conectada y/o es nutricionalmente independiente del organismo multicelular del que procede. Una célula estromal es una célula preferente tal y como se describe en la presente memoria descriptiva.

Los términos "población celular" y "población de células" se relacionan indistintamente con un conjunto de una pluralidad de células. En la realización más restringida, una población celular comprende dos células, pero más típicamente una multitud de células. El término abarca tanto poblaciones de células esencialmente idénticas, tales como las poblaciones celulares originadas a partir de una única célula clonogénica, como poblaciones celulares heterogéneas, es decir, células de origen heterogéneo y/o que difieren entre sí en al menos un rasgo funcional o estructural. El término abarca poblaciones de células en suspensión únicamente, poblaciones de células adherentes

únicamente y poblaciones mixtas de células en suspensión y adherentes. Una población celular puede comprender tanto células madre como células que carecen de propiedades de células madre. En otro ejemplo no excluyente, una población celular comprende tanto células vivas como células muertas.

5 A menos que el contexto indique lo contrario, "CD", utilizado normalmente junto con un número (por ejemplo, "CD34"), significa en la presente memoria descriptiva "Cúmulo de Diferenciación".

El término "clonogénico" se relaciona con la capacidad de una célula para expandirse, dando lugar de este modo a una multitud de células hijas, que normalmente son genotípicamente idénticas. Una célula "clonogénica" también puede denominarse "unidad formadora de colonias" o "UFC".

10 El término "colagenasa", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con una enzima (E.C. 3.4.24.7) que es capaz de romper los enlaces peptídicos del colágeno. En general, la colagenasa puede ayudar a destruir estructuras extracelulares. El término no implica ninguna limitación específica sobre el tipo o el origen de la colagenasa, a menos que se especifique lo contrario. La colagenasa puede ser recombinante o de su fuente natural. Muchas colagenasas disponibles en el mercado comprenden otras actividades enzimáticas, además de la C.E. 3.4.24.7. Tales colagenasas comercialmente disponibles son adecuadas en el contexto de la presente invención (véanse los Ejemplos).

15 La expresión "confluencia" se utiliza en la presente memoria descriptiva para describir la proporción de la superficie base de un recipiente de cultivo que está cubierta por células, típicamente células adherentes. La confluencia suele indicarse como "% de confluencia".

20 Las expresiones "% de confluencia" o "porcentaje de confluencia" se relacionan con el porcentaje de la superficie base de una placa de cultivo que está cubierta por células, típicamente células adherentes, es decir, la suma del área total de células en relación con la superficie base de la placa de cultivo. Por ejemplo, el 50 por ciento de confluencia significa que prácticamente la mitad de la superficie está cubierta y aún queda espacio para que crezcan las células. el 100 % de confluencia significa que la superficie está completamente cubierta por las células y que ya no queda espacio para que las células crezcan como una monocapa. En el contexto de la presente invención, las células suelen pasarse antes de alcanzar el 100% de confluencia para mantener de forma óptima su fenotipo de proliferación.

25 La expresión "baja confluencia" significa un porcentaje de confluencia del 50 % o menos, típicamente del 10 al 50 %. Las expresiones "subconfluente" y "subconfluencia" significan un porcentaje de confluencia superior al 50 % pero no superior al 80 %.

30 El término "recipiente de cultivo" o "recipiente de cultivo celular" se relaciona generalmente con un recipiente adecuado para el cultivo de células de mamífero. Los recipientes de cultivo típicos son los matraces, las placas y las pilas (en las que las pilas suelen estar compuestas por multitud de placas apiladas unas sobre otras). Los recipientes de cultivo particularmente adecuados en el contexto de las presentes invenciones son los recipientes de cultivo que permiten la adherencia de células en el fondo del recipiente de cultivo; tales recipientes son matraces, placas y pilas con una superficie de fondo plana.

35 Con respecto a un recipiente de cultivo, los términos "superficie" o "superficie base" se refieren indistintamente a la superficie interior del suelo del recipiente de cultivo, es decir, la superficie a la que las células con propiedades adherentes se adhieren normalmente mientras crecen en ese recipiente de cultivo. Normalmente, dicha superficie se encuentra en el fondo interior del recipiente de cultivo y está confinada únicamente por las paredes laterales del recipiente de cultivo.

40 El término "densidad" o "densidad celular" se relaciona con el número de células por área bidimensional, tal como en particular el número de células por cm^2 , típicamente por cm^2 de superficie de tierra del recipiente de cultivo celular, a menos que el contexto dicte otra cosa. Normalmente, el término se utiliza para describir cuántas células se siembran en el recipiente de cultivo, por ejemplo, al inicio de un pasaje concreto. La superficie total de suelo de dicho recipiente de cultivo y el número total de células sembradas en ese recipiente de cultivo definen entonces la densidad celular por cm^2 de dicho recipiente de cultivo al inicio de dicho pasaje. En la práctica, el número de células utilizadas como inóculo al principio de un pasaje (I) se determina convenientemente por medio del recuento de células antes del comienzo de dicho pasaje; I es, por tanto, función de la densidad celular y de la superficie molida de la placa de cultivo. A menos que se indique explícitamente lo contrario, la "densidad celular" se relaciona con la densidad celular media sobre toda la superficie base del recipiente de cultivo; no obstante, en la presente invención es preferente que las células estén distribuidas uniformemente por toda la superficie base del recipiente de cultivo.

55 El término "diámetro" o "diámetro celular", con respecto a una célula, se relaciona con el diámetro más largo de una célula vista desde arriba. En el contexto del presente documento, el diámetro de una célula se determina mientras la célula está en cultivo adherente, es decir, la célula se adhiere a la placa de cultivo. Es importante que las células se encuentren en un estado de subconfluencia. La subconfluencia se considera ventajosa para la reproducibilidad de la determinación porque se cree que las células subconfluentes sustancialmente no se inhiben entre sí por inhibición de contacto. Para determinar el diámetro, se fotografían una o más células o se observan o registran visualmente de otro modo, normalmente con un microscopio, desde la dimensión perpendicular (es decir, 90°) a la superficie de la placa de cultivo a la que se adhieren la célula o células. Los límites de la zona se definen manualmente en una imagen

gráfica (es decir, una fotografía) de la celda. Preferentemente, el recipiente de cultivo no se agita antes de registrar la imagen gráfica. En el caso de una célula bipolar, el diámetro es la distancia entre los dos polos de la célula. Para las células multipolares, por ejemplo triangulares, el diámetro es la distancia entre los dos polos de la célula más alejados entre sí. En cada caso, "distancia" significa la línea de conexión recta más corta entre los dos polos respectivos.

- 5 El término "diámetro medio" se relaciona con la media de los diámetros de dos o más células individuales, en las que en una primera etapa el diámetro de cada célula individual se determina como se ha descrito anteriormente, y a continuación en una etapa posterior el diámetro medio se determina como la media aritmética del diámetro celular determinado en la primera etapa

- 10 Los términos "expandir" o "en expansión", tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se relacionan generalmente con la proliferación de una célula o de una población de células. Normalmente, la expansión en el contexto de la presente invención se produce *in vitro* o *ex vivo*. Normalmente, la expansión es una actividad o proceso posterior al aislamiento de las células. Normalmente, durante la expansión aumenta el número total de células. El aumento del número de células puede describirse haciendo referencia a "Duplicación(es) acumulativa(s) de la población" o haciendo referencia a "Número(s) de pasaje ("P")", o indicando el número total de células en la fase respectiva, etc.

- 15 Los términos "expresar", "expresado" y "expresión", "expresión génica" y similares, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se relacionan con el uso de la información de un gen en la síntesis de un producto génico funcional. La expresión génica comprende al menos la transcripción, y opcionalmente comprende una o más características adicionales, opcionalmente seleccionadas de la lista abierta que comprende la edición del ARN, la traducción y la modificación postraduccional. Cuando se determina la expresión génica, se determina la presencia de un producto de expresión, como el ARN no editado o editado, o incluso la proteína codificada. Los términos anteriores, utilizados en relación con un gen o locus concreto, pretenden especificar la expresión de la información genética de dicho gen o locus; por ejemplo, cuando se dice que se expresa APCDD1, se quiere decir que se expresa el gen APCDD1.

- 25 El término "extracto", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con el aislamiento de un entorno biológico. De acuerdo con el contexto, el término puede significar "extraer" (verbo) o la entidad física que se ha extraído (por ejemplo, una célula o una población celular obtenida por extracción de su entorno natural). Por ejemplo, cuando se extraen células del cordón umbilical, las células se aíslan de su ubicación original en el cordón umbilical y/o se separan de otras zonas anatómicas del cordón umbilical. Preferentemente, una célula extraída es una célula fuera de un cuerpo vivo y/o separada físicamente de los vasos sanguíneos y/o separada físicamente de otras células del mismo órgano o tejido y/o separada físicamente de zonas anatómicas no celulares del mismo órgano o tejido.

- 35 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "citometría de flujo" se relaciona con una tecnología biofísica basada en láser o impedancia, adecuada para el recuento de células, la clasificación de células, el análisis de las propiedades celulares y la detección de biomarcadores (tal como, en particular, la detección de moléculas de la superficie celular, como las moléculas de Clúster de Diferenciación (CD)). La citometría de flujo requiere células en suspensión; para analizar células adherentes, éstas deben separarse del sustrato, por ejemplo, el recipiente de cultivo, al que se adhieren, por ejemplo, por medio de un tratamiento enzimático como la tripsinización, por el que se convierten en células en suspensión. Las células en suspensión, es decir, las células en una corriente de fluido se hacen pasar por un aparato electrónico de detección (aparato de citometría de flujo). El aparato de citometría de flujo analiza la célula, por ejemplo, basándose en la dispersión de luz específica de cada célula. Puede utilizarse un aparato comercial de citometría de flujo, tal como el citómetro de flujo FACSAria III (BD Biosciences). Los datos generados por los citómetros de flujo pueden representarse en una sola dimensión, para producir un histograma, o en gráficos de puntos bidimensionales o incluso en tres dimensiones. Los gráficos pueden realizarse mediante el uso de las escalas que se prefieran, como la lineal o la logarítmica. Las regiones de estos gráficos pueden separarse secuencialmente, en función de la intensidad de fluorescencia, creando una serie de extracciones de subconjuntos, denominadas "puertas".

- 40 La "clasificación celular activada por fluorescencia", o indistintamente "CCAF", como se utiliza en la presente memoria descriptiva, es un tipo especializado de citometría de flujo. CCAF es un procedimiento para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más poblaciones, basándose en las características específicas de dispersión de la luz y/o fluorescencia de cada célula. El tipo de fluoróforo utilizado como etiqueta para CCAF no está particularmente limitado; a veces, los fluoróforos se unen a un anticuerpo que reconoce un rasgo diana, tal como una proteína de la superficie celular (tal como, en particular, la detección de moléculas de la superficie celular, como las moléculas del Clúster de Diferenciación (CD)). Alternativamente, un fluoróforo puede estar unido a una entidad química con afinidad por la membrana celular u otra estructura celular. Cada fluoróforo tiene un pico característico de excitación y longitud de onda de emisión, que es detectado por el aparato adecuado para CCAF. Puede utilizarse un aparato comercial, como el citómetro de flujo FACSAria III (BD Biosciences).

- 55 El término "heterólogo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, describe algo que consta de múltiples elementos diferentes. Por ejemplo, la transferencia de células de un individuo a otro constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del individuo.

Los términos "inmortal" e "inmortalidad", tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, designan células que pueden dividirse sin estar sujetas al límite de Hayflick (el límite de Hayflick es el punto en el que las células ya no pueden dividirse debido a daños en el ADN o a telómeros acortados). Las células inmortales suelen expresar la enzima telomerasa que alarga los telómeros, pero no es un requisito estricto.

- 5 El término "inóculo", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con el número total de células con el que se inicia un cultivo celular determinado (pasaje) en un recipiente de cultivo determinado.

Por "aislado" se entiende el material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, una "célula aislada", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con una célula que ha sido purificada del entorno celular y extracelular, tal como el tejido, que la rodea en un estado natural, por ejemplo, una célula estromal mesenquimal que ha sido extraída del tejido del cordón umbilical que normalmente es adyacente a la célula. En una descripción alternativa, una "célula aislada" o similares, tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se relacionan con el aislamiento *in vitro* y/o purificación de una célula de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes del tejido en el que la célula reside normalmente. A menos que el contexto indique lo contrario, una "célula aislada" no tiene por qué ser necesariamente una célula única desprovista de cualquier otra célula; por el contrario, incluso una población de dos o más células, tal como una multitud de células, puede denominarse "aislada" cuando dicha población de células está aislada en el sentido de que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan a dicha población de células en su estado nativo. Por ejemplo, una población de células estromales mesenquimales puede denominarse "aislada" cuando se ha extraído del tejido original, como el cordón umbilical. De acuerdo con esta definición de la palabra "aislado", "aislar", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, es el verbo que describe la actividad para obtener material "aislado", como por ejemplo una célula aislada.

El término "linaje-comprometido" como se usa en la presente memoria descriptiva se relaciona con una célula progenitora que es capaz de divisiones mitóticas, pero típicamente incapaz de un número ilimitado de divisiones mitóticas. Finalmente, la progenie de una célula comprometida con el linaje está determinada a diferenciarse.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "medio" se relaciona con una mezcla acuosa adecuada para el cultivo de células, en particular células de mamíferos. La mezcla acuosa es típicamente una solución, aunque también se incluyen suspensiones y mezclas coloidales. El medio suele ser líquido, aunque algunos medios también pueden congelarse temporalmente, por ejemplo, con fines de almacenamiento; en cualquier caso, un medio se utiliza para el cultivo celular cuando es líquido. Un medio puede ser un "medio basal", que es una mezcla acuosa definida, o un "medio de crecimiento", que es una mezcla acuosa que comprende un medio basal y al menos un suplemento, y que normalmente tiene la capacidad de mantener la viabilidad de las células *ex vivo*, y opcionalmente la expansión de las células, también *ex vivo*. A menos que se especifique expresamente, el contexto dicta si se trata de un medio basal o de un medio de crecimiento. Un medio basal es preferentemente un medio químicamente definido. Un medio de crecimiento comprende preferentemente un medio basal (típicamente 85 % a 99,5 % vol./vol.) más al menos un suplemento derivado de seres humanos, animales o plantas, como suero, lisado celular o, particularmente en el contexto de la presente invención, lisado de plaquetas.

El término "mesenquimal" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a una célula que pertenece a un tipo de célula mesenquimal, tal como una célula grasa, una célula de los tejidos conjuntivos, hueso, cartílago, sangre, vasos linfáticos y vasos sanguíneos, así como a una célula estromal o célula madre que es capaz de diferenciarse en un tipo de célula mesenquimal. Sin que ello implique limitación alguna de la presente invención, las células mesenquimales están *in vivo* a veces poco compactadas y fijadas en una sustancia gelatinosa de base. Normalmente, una célula mesenquimal es de origen mesodérmico (mesodermo embrionario o mesodermo extraembrionario). A veces, una célula mesenquimal es una célula estromal (célula estromal mesenquimal) o una célula madre (célula madre mesenquimal), o una célula derivada de cualquiera de ellas.

45 El término "célula estromal mesenquimal", abreviado "CEM", se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a una célula de origen mesenquimal, es decir, de origen del estroma, tal como el tejido conjuntivo derivado particularmente del mesodermo. El origen tisular de una "célula estromal mesenquimal" no está limitado como tal; sin embargo, de acuerdo con aspectos preferentes de la presente descripción, una "célula estromal mesenquimal" se origina en el cordón umbilical, más precisamente en la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical, como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. Una célula estromal mesenquimal suele expresar los marcadores de superficie CD105 y CD73, y normalmente también CD90. Preferentemente, la "célula estromal mesenquimal" tal como se describe en la presente memoria descriptiva se caracteriza por la expresión de CD105 (conocida como endoglina), CD73 (conocida como ecto 5' nucleotidasa) y CD90 (también conocida como Thy-1. Las células estromales mesenquimales se caracterizan por no expresar sustancialmente antígenos hematopoyéticos, como en particular CD45, CD34, CD14, CD19 o CD3. Normalmente, las CEMs expresan moléculas MHC de clase I *in vitro*, pero no moléculas de clase II a menos que sean estimuladas, por ejemplo por medio de interferón, en cultivo tisular. De este modo, un fenotipo de marcador de superficie típico de las CEMs es CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34- CD14-, CD19-, CD3-, ALH DR-. Aunque identifica inequívocamente a las CEMs, este perfil de marcadores de superficie es complejo. Un rasgo característico de las CEMs es su capacidad para diferenciarse *in vitro* en diversos tipos celulares, como osteoblastos, adipocitos y condroblastos. Normalmente, las CEM son adherentes al plástico *in vitro*. El término "célula estromal mesenquimal" no requiere intrínsecamente que la célula a la que se hace referencia

sea una célula madre; no obstante, como se describe en la presente memoria descriptiva, las CEMs descritas en la presente memoria descriptiva, u obtenidas de acuerdo con la presente invención, pueden tener propiedades similares a las de las células madre en divulgaciones preferentes.

El término "célula precursora de linaje mesenquimal" se relaciona con una célula estromal mesenquimal que tiene la capacidad de autorrenovarse manteniendo la multipotencia y la capacidad de diferenciarse en una serie de tipos celulares de origen mesenquimal, por ejemplo, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células estromales, fibroblastos y tendones, y posiblemente también en células de origen no mesenquimal, por ejemplo, células neurales y células epiteliales. El término "célula precursora de linaje mesenquimal" se relaciona por tanto con una célula que es capaz de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, aunque como la célula es multipotente (en oposición a totipotente). Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se entiende que una "célula precursora del linaje mesenquimal" es una célula del linaje mesodermo. Sin embargo, a menos que se especifique lo contrario o que el contexto dicte lo contrario, el término "célula precursora de linaje mesenquimal" no implica ninguna limitación sobre el origen tisular de la célula respectiva. De este modo, en general, las células denominadas "células precursoras de linaje mesenquimal" no se limitan a un origen tisular concreto y pueden proceder, por ejemplo, de la médula ósea, el cordón umbilical, la sangre periférica adulta, el tejido adiposo, el hueso trabecular y la pulpa dental. De acuerdo con aspectos preferentes descritos en la presente memoria descriptiva, la "célula precursora de linaje mesenquimal" procede del cordón umbilical, más concretamente de la Jalea de Wharton del cordón umbilical, como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. El término "célula precursora de linaje mesenquimal" incluye tanto a las células progenitoras como a su progenie indiferenciada. El término "célula precursora de linaje mesenquimal" también incluye las células precursoras mesenquimales, las células estromales multipotentes, las células madre mesenquimales y su progenie indiferenciada. De acuerdo con la descripción del presente documento, es muy preferente que una "célula precursora de linaje mesenquimal" sea una célula madre, tal como se define en la presente memoria descriptiva, con la limitación de que la célula madre no sea totipotente.

Los términos "multi" y "múltiple" utilizados en la presente memoria descriptiva significan una multitud, es decir, cualquier número de dos o más.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "multipotente" se relaciona con una célula que es capaz de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. El término "multipotente" engloba las células progenitoras y toda la progenie de dichas células que siga siendo multipotente. El término "multipotente" se relaciona con una célula progenitora que tiene el potencial de diferenciarse en más de un tipo celular discreto. Sin querer ceñirnos a una teoría concreta, se entiende que una célula madre multipotente se sitúa en la cima de una jerarquía de linajes y puede generar múltiples tipos de células diferenciadas. Sin limitación, se pueden encontrar células multipotentes en el cordón umbilical, el tejido adiposo, las células cardíacas, la médula ósea y la pulpa dental. A veces, las células multipotentes son pluripotentes.

El término "perivascular" o "zona perivascular" o "área perivascular", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con un área o zona física cercana a un vaso, tal como un vaso sanguíneo. La "zona perivascular" o "área perivascular" se representa como punto (5) en la Fig. 1. En particular, la zona/área perivascular del cordón umbilical (5) se relaciona con cada zona/área alrededor de cada vaso sanguíneo del cordón umbilical. La zona/área perivascular puede definirse adecuadamente como el espacio que se extiende hasta 3 mm de las paredes externas de cada uno de los vasos del cordón umbilical (véase el documento WO 2004/072273 A1). A modo de ejemplo, la zona/área perivascular ha sido descrita por Takechi et al., 1993 (Placenta vol. 14; p. 235-245).

El término "lisado de plaquetas" se relaciona con una preparación obtenible a partir de plaquetas sanguíneas (también llamadas trombocitos). Las plaquetas se obtienen de un donante, preferentemente humano, ya sea aisladas de unidades de sangre total extraídas y agrupadas, o por medio de aféresis plaquetaria: se extrae sangre del donante y se hace pasar por un dispositivo que extrae las plaquetas. Tras su aislamiento, las plaquetas, por ejemplo (re)-suspendidas en plasma, se suelen lisar, por ejemplo por medio de uno o más ciclos de congelación/descongelación. El lisado plaquetario está disponible en un gran número de proveedores comerciales, por ejemplo, MacroPharma (Mouvoux, Francia), en bancos de sangre clínicos, por ejemplo, el Banco de Sangre de la Policlínica de Módena (Italia), pero también puede prepararse directamente a partir de plaquetas sanguíneas, como describen, por ejemplo, los documentos Naaijken et al., Cell Tissue Res., 2012, vol. 348, p. 119-130 y WO 2013/042095 A1.

El término "pluripotente", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con una célula que tiene el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo), pero no en células de la línea germinal. Normalmente, una célula pluripotente puede diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo adulto, excepto en las células de la línea germinal. En una realización, una célula pluripotente es una célula capaz de diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares del cuerpo de los mamíferos - sin querer atarse a ninguna teoría, éstos pueden ser aproximadamente 260 tipos celulares. Una célula pluripotente puede autorrenovarse y permanecer latente o quiescente dentro de un tejido. Una célula pluripotente cumple preferentemente con todo lo siguiente: (i) es capaz de proliferar en estado indiferenciado, (ii) mantiene un cariotipo normal durante un cultivo prolongado y (iii) mantiene la capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo) incluso después de un cultivo prolongado.

El término "número de pasaje", abreviado "P", seguido de un número (por ejemplo, "P1"), se relaciona con el número de veces que se ha subcultivado un cultivo de células. De este modo, el término "número de pasaje" es un término útil para describir un estado durante la expansión de las células.

5 El término "Duplicación de la Población", abreviado "DP", se utiliza en la presente memoria descriptiva para describir que el número de células se ha duplicado, por ejemplo, en un intervalo de tiempo desde un punto temporal temprano t_0 hasta un punto temporal posterior t_{0+x} . En ese caso, x designa el intervalo de tiempo durante el cual se ha duplicado el número de células. Por ejemplo, t_0 puede ser el momento del aislamiento primario, o el momento en que se inició un determinado etapa. De este modo, el término "duplicación de la población" se relaciona con la expansión de las células. El término se relaciona generalmente con la duplicación del número de células *in vitro*. La duplicación de la población (DP) se calcula por medio de la fórmula:

$$DP = \log(N/N_0)/\log 2$$

en la que

N_0 es el número de células sembradas y

N es el número de células cosechadas

15 (Purpura et al., 2004, Stem Cells. Vol. 22, p. 39- 50).

El término "Duplicación Acumulativa de la Población" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse al número total de veces que las células de una población celular se han duplicado *in vitro*, desde un momento determinado, por ejemplo, su aislamiento primario. De este modo, también el término "duplicación acumulativa de la población" es un término que se relaciona con la expansión de las células, generalmente *in vitro*. La DP acumulada se determina para cada pasaje. El número DP acumulado se calcula por medio de la fórmula:

$$n = \log(N /N_0)/\log 2 + X$$

en la que

n = el número acumulado de DP,

N_0 = es el número de células sembradas (es decir, al principio de un pasaje),

25 N = el número de células cosechadas (es decir, al final de dicho pasaje),

X = el número DP acumulado al principio de dicho pasaje.

N_0 se determina adecuadamente por medio del recuento de células antes del comienzo de un pasaje; N_0 es una función de la densidad celular y de la superficie base de la placa de cultivo. N se determina convenientemente por recuento celular tras desprendimiento, por ejemplo tripsinización, al final de un pasaje.

30 Las DP acumulativas son aditivas (de ahí la X en la fórmula anterior); por ejemplo, cuando las células han sufrido 5 DP acumulativas durante un primer pasaje P1 y de nuevo 5 DP acumulativas durante un segundo pasaje posterior P2, entonces las células han sufrido 10 DP acumulativas durante el curso total de P1 más P2. Las células recién aisladas tienen una DP acumulativa = 0 por definición. De este modo, al inicio de P0, $X = 0$. Dado que a veces es difícil determinar N_0 antes de P0 (y, por tanto, determinar n para P0), las Duplicaciones de Población acumulativas se determinan opcionalmente sólo a partir de P1; no obstante, cuando éste sea el caso, se indicará específicamente en la presente divulgación.

Es posible indicar la DP acumulada como una estimación redondeada al número entero más próximo. Cuando se utilizan condiciones de cultivo definidas, es posible convertir aritméticamente el número de pasajes en DP acumulada, y *viceversa*.

40 El término "célula progenitora" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a una célula, que puede ser una célula madre y/o descendiente de una célula madre. Los progenitores suelen ser los descendientes de las células madre, sólo que están más limitados en su potencial de diferenciación o capacidad de autorrenovación. Las células progenitoras pueden ser, por ejemplo, multipotentes o unipotentes.

45 Los términos "secretar" o "liberar", cuando se usan en la presente memoria descriptiva en conexión con una célula, generalmente se relacionan con cualquier material que es externalizado desde la célula al ambiente externo. Dicho material ha sido típicamente producido y/o modificado por la célula, aunque esto no es un requisito. Por ejemplo, algunas células secretan proteínas y/o moléculas reguladoras como hormonas, prostaglandinas y neurotransmisores, y/o microvesículas y/o exosomas, a su respectivo entorno externo. Por ejemplo, una prostaglandina producida por una célula puede exteriorizarse en el entorno de la célula. Dichos términos, tal y como se utilizan en la presente memoria

descriptiva, no se limitan ni a la secreción *in vivo/entorno in vivo* ni a la secreción *in vitro/entorno in vitro*, a menos que el contexto indique lo contrario.

5 El término "volumen celular" o simplemente "volumen", con respecto a una célula, se relaciona con el volumen celular determinable por citometría de flujo, en particular análisis CCAF, más particularmente por determinación de la luz dispersada hacia delante (LDHA). En el contexto de la presente divulgación, el volumen de una célula se determina mientras la célula, por ejemplo una célula desprendida, tal como una célula tripsinizada (tras un cultivo adherente) o una célula liberada de colagenasa (tras un aislamiento a partir de un tejido), está en suspensión, es decir, la célula no se adhiere a una placa de cultivo o a un tejido. La determinación de la CSE y, opcionalmente, del volumen celular se describe a continuación.

10 El término "volumen medio" o "volumen celular medio" se relaciona con la media del volumen de dos o más células individuales, en las que en una primera etapa el volumen de cada célula individual se determina por citometría de flujo como se describe en la presente memoria descriptiva, y a continuación en una segunda etapa posterior el volumen medio se determina como la media aritmética del volumen celular de las células individuales, como se determina en la primera etapa. Típicamente, al menos 1.000 células se someten a la primera y segunda etapa para la determinación del volumen celular medio; en otras palabras, la media representa la media de al menos 1.000 células.

15 El término "célula madre" se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a una célula eucariota capaz de dar lugar a hijas fenotípica y genotípicamente idénticas ("autorrenovables"), así como a al menos otro tipo de célula final (por ejemplo, células diferenciadas terminalmente). El término "célula madre" se relaciona con una célula que puede ser totipotente, pluripotente o multipotente, así como a una célula progenitora y/o precursora derivada de su diferenciación y/o a una célula progenitora de linaje comprometido. En general, el término "célula madre" puede referirse a una célula madre adulta o a una célula madre embrionaria. El término "célula madre" puede referirse opcionalmente a una célula madre inducida, tal como una célula madre pluripotente inducida, pero más preferentemente se relaciona con una célula que no ha sido inducida.

25 Los términos "esterilidad" o "propiedad similar a las células madre"/"propiedades similares a las células madre" se utilizan indistintamente para designar la propiedad de una célula, en particular la capacidad de autorrenovación y la capacidad de generar células diferenciadas. Más explícitamente, las células con propiedades similares a las células madre pueden generar células hijas idénticas a su madre (autorrenovación), así como producir progenie con un potencial más restringido, como las células diferenciadas. Las células con propiedades similares a las células madre se caracterizan por un cierto grado de potencia, es decir, potencial para producir progenie diferenciada. Algunas células con propiedades similares a las células madre pueden ser capaces de generar múltiples tipos de células diferenciadas (por ejemplo, "multipotentes" o "pluripotentes"), mientras que otras pueden ser capaces de producir un solo tipo de célula diferenciada ("unipotentes"). Aunque las células con propiedades similares a las células madre tienen la capacidad de autorrenovarse, la mayoría de las células somáticas, incluidas las que tienen propiedades similares a las células madre, cuando se cultivan *in vitro* son capaces de expandirse durante un número finito de duplicaciones acumulativas de la población antes de la detención replicativa o la senescencia. En realizaciones preferentes, las células estromales mesenquimales de acuerdo con la presente divulgación son células estromales mesenquimales con propiedades similares a las de las células madre.

40 En general, el "estroma" es la parte de un tejido u órgano humano o animal que tiene un papel en el soporte mecánico del tejido, tal como proporcionar soporte conectivo, estructural, y/o (preferentemente y) en el soporte funcional del tejido. De este modo pues, en el cuerpo vivo, el estroma es el marco conectivo y funcional de un tejido biológico u órgano (a diferencia del parénquima, que es el aspecto funcional de un tejido). El término "estroma", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con las células del tejido conjuntivo de cualquier órgano, por ejemplo, sin limitación, en el cordón umbilical, la mucosa uterina (endometrio), la próstata, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el ovario. En el órgano respectivo, se entiende que el estroma sustenta la función de las células parenquimatosas de ese órgano. De este modo, el estroma está formado por todas las partes que no realizan las funciones específicas del órgano, por ejemplo, el tejido conjuntivo, los vasos sanguíneos, los nervios, los conductos, etc. De este modo, el estroma del cordón umbilical es una matriz compuesta por el cordón umbilical excepto los vasos, la zona perivascular y los epitelios amnióticos. El término estroma puede referirse al estroma de todo un órgano o a una zona anatómica específica del mismo. En particular, el término estroma puede referirse al estroma del cordón umbilical en su totalidad o a una zona anatómica específica del mismo, es decir, al estroma contenido en una sección concreta del cordón umbilical.

55 El término "estroma", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con cualquier cosa presente en el estroma o derivada del estroma. El término no se limita a la ubicación del material "estromal" (por ejemplo, célula estromal) que reside dentro del estroma, sino que también se relaciona con el material (por ejemplo, una célula) que estaba presente en el estroma en un órgano de un cuerpo humano o animal vivo, pero que posteriormente se ha extraído o aislado del órgano de forma que ya no está presente en un órgano de un cuerpo humano o animal vivo. En otras palabras, el término "estromal" se relaciona con el origen específico *in vivo* del material (por ejemplo, una célula), independientemente de si el material (por ejemplo, la célula) ha sido extraído o aislado. El material (por ejemplo, una célula) que se ha extraído o aislado del estroma también puede denominarse en la presente memoria descriptiva "derivado del estroma", "derivado del estroma" o similar. En algunas realizaciones preferentes de la presente

descripción, el material estromal (por ejemplo, la célula estromal) es o ha sido extraído o aislado, de forma que no está, o ya no está, presente en un órgano de un cuerpo humano o animal vivo.

De este modo pues, una "célula estromal" es una célula biológica presente en el estroma o derivada del estroma, es decir, extraída o aislada, de forma que no está, o ya no está, presente en un órgano de un cuerpo humano o animal vivo. Una célula estromal está viva a menos que se especifique lo contrario o que el contexto dicte otra cosa. En muchos órganos, los fibroblastos y los pericitos se encuentran entre los tipos más comunes de células estromales. Como ejemplo ilustrativo, una célula estromal puede ser una célula presente en el estroma (por ejemplo, el estroma del cordón umbilical) o una célula que ha sido aislada (por ejemplo, extraída)-y opcionalmente expandida- del estroma (por ejemplo, el estroma del cordón umbilical). Las células estromales suelen ser células no malignas.

El término "singénico" se utiliza en la presente memoria descriptiva para describir cualquier cosa derivada de individuos o células con genotipos idénticos, tales como gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica, o sus células.

El término "totipotente", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con una célula que es capaz de dividirse y producir todas las células diferenciadas de un organismo. Típicamente, una célula totipotente es capaz de dar lugar a un embrión completo. En los mamíferos, normalmente sólo el cigoto y los blastómeros posteriores son totipotentes.

El término "cordón umbilical", también llamado "cordón naval", se relaciona con el conducto entre el recién nacido y la placenta en los animales placentarios. Durante el desarrollo prenatal, el cordón umbilical forma parte fisiológica y genéticamente del feto. Aunque un cordón umbilical está presente durante toda la embriogénesis, en la que conecta la placenta con el embrión o feto en desarrollo, en la presente especificación el término se relaciona específicamente con el cordón umbilical de un bebé que ya ha nacido. En los seres humanos, el cordón umbilical consta normalmente de tres vasos sanguíneos, a saber, dos arterias (las arterias umbilicales) y una vena (la vena umbilical). Los tres vasos sanguíneos suelen estar incrustados en la Jalea de Wharton. Ni la placenta, ni partes de ella, ni el recién nacido, ni partes de él, forman parte del cordón umbilical; ese término se refiere exclusivamente al conducto.

El término "unipotente" se relaciona con una célula con propiedades similares a las de una célula madre que sólo puede producir un tipo de descendiente diferenciado. Tales células unipotentes también pueden denominarse células progenitoras.

El término "viable", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, cuando se relaciona con una célula, significa que la célula es una célula viva. Las células vivas suelen ser metabólicamente activas. Aunque se pueden utilizar diferentes agentes colorantes y fluorocromos para teñir células no viables, en la presente memoria descriptiva se da preferencia a la tinción con 7-amino actinomicina D (7-AAD). El 7-AAD es un colorante impermeable a la membrana que generalmente se excluye de las células viables. Se une al ADN de doble cadena intercalándose entre pares de bases en regiones ricas en G-C. el 7-AAD puede excitarse a 488 nm, por ejemplo con un láser de argón, y emite fluorescencia a una longitud de onda máxima de 647 nm. Mediante el uso de 7-AAC, la viabilidad de las células puede determinarse por citometría de flujo, en particular CCAF (clasificación celular activada por fluorescencia).

El término "recipiente" (que no debe confundirse con "recipiente de cultivo", véase más adelante), tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere generalmente a un tubo o canal (tal como una vena o una arteria) en el que se contiene y transporta o circula un fluido corporal (como la sangre). Salvo que el contexto indique lo contrario, el término "vaso" se utiliza en la presente memoria descriptiva también para referirse específicamente a los vasos del cordón umbilical. En los seres humanos y muchos otros mamíferos, el cordón umbilical contiene normalmente tres vasos sanguíneos, es decir, una vena, que *in vivo* transporta sangre oxigenada y rica en nutrientes al feto, y dos arterias que *in vivo* transportan sangre desoxigenada y pobre en nutrientes; aunque se han descrito casos ocasionales en los que sólo hay dos vasos (una vena y una arteria) en el cordón umbilical.

El término "Jalea de Wharton", abreviado "JW", se relaciona con una sustancia gelatinosa de origen animal placentaria que comprende células. Típicamente, la Jalea de Wharton comprende células estromales, más particularmente células estromales mesenquimales. Además, la Jalea de Wharton suele contener mucopolisacáridos, como ácido hialurónico y sulfato de condroitina, así como agua. Aunque la Jalea de Wharton también se ha descrito en el humor vítreo del globo ocular, en esta especificación es preferente encarecidamente que la Jalea de Wharton forme parte del cordón umbilical de un animal recién nacido placentado, preferentemente un mamífero, como un ser humano. En ese caso, la Jalea de Wharton también puede denominarse *substantia gelatinosa funiculi umbilicalis*. En otras palabras, es preferente encarecidamente que la Jalea de Wharton, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, sea de origen de cordón umbilical, y aún más preferentemente de origen de cordón umbilical humano. Como se describe a continuación, un cordón umbilical contiene normalmente Jalea de Wharton en la zona perivascular (5), en la zona intervascular (4) y en la zona subamniótica (1b).

"Jalea de Wharton perivascular" o "PVJW" o "VPJW" se relacionan todos sinónimamente con la Jalea de Wharton de una zona anatómica específica del cordón umbilical, a saber, la zona anatómica de la Jalea de Wharton que se encuentra alrededor de los vasos del cordón umbilical (5). Para el caso de un cordón umbilical humano, que representa una realización preferente, la PVJW se localiza en la zona que se extiende desde la superficie externa del vaso 3,0

mm o menos hacia el exterior (para una revisión, véase Davies et al., Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol. 6, p. 1620-1630). Por lo tanto, cuando se elimina por completo la zona situada a menos de 3,0 mm de la pared exterior de los vasos del cordón umbilical humano, se elimina por completo la zona perivascular y, por lo tanto, cualquier Jalea de Wharton perivascular comprendida en ella, de acuerdo con sea el caso. A título ilustrativo, véase también la Fig. 1.

5 Las abreviaturas "PVJW" y "VPJW" también se utilizan en la presente memoria descriptiva como sinónimos para referirse a las células procedentes de la zona perivascular, incluida la "Jalea de Wharton perivascular", de acuerdo con el caso, por ejemplo en las leyendas de las figuras. Las células mesenquimales derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW) también pueden denominarse "células mesenquimales derivadas de la zona perivascular".

10 El término "estroma subamniótico" se relaciona con la zona (1b) directamente adyacente al epitelio amniótico (1a) del cordón umbilical. Para el caso de un cordón umbilical humano, que representa una realización preferente, el estroma subamniótico se localiza en la zona que se extiende desde la superficie interna del epitelio amniótico 3,0 mm o menos hacia el interior.

15 El término "Jalea de Wharton subamniótica" se relaciona con la Jalea de Wharton en el estroma subamniótico (1b) directamente adyacente al epitelio amniótico (1a) del cordón umbilical. Para el caso de un cordón umbilical humano, que representa una realización preferente, la Jalea de Wharton subamniótica se localiza en la zona que se extiende desde la superficie interna del epitelio amniótico 3,0 mm o menos hacia el interior.

20 El término "Jalea de Wharton estromal", abreviado "JWE", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se relaciona con la Jalea de Wharton del cordón umbilical que excluye la zona perivascular (4). Por lo tanto, el término "Jalea de Wharton estromal" no incluye la zona perivascular (4) y, en consecuencia, no incluye las células de la zona perivascular (4). Aunque ha habido cierto debate en la técnica sobre si la zona perivascular comprende o no células estromales mesenquimales, dicho debate no es crítico para la presente invención, al menos porque la presente invención no contempla el aislamiento de células estromales mesenquimales de la zona perivascular, al menos por la razón de que la zona perivascular no es una fuente de células de acuerdo con la presente invención. A menos que se indique explícitamente lo contrario, el estroma subamniótico (1b) está incluido en el estroma al que se hace referencia en la presente memoria descriptiva. A menos que se indique explícitamente lo contrario, la Jalea de Wharton subamniótica está incluida en la Jalea de Wharton denominada en la presente memoria descriptiva "Jalea de Wharton estromal". La Jalea de Wharton subamniótica se encuentra en el estroma subamniótico. La abreviatura "JWE" también se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a las células procedentes de la "Jalea de Wharton estromal", por ejemplo, en las leyendas de las figuras. De este modo, en referencia a la Fig. 1, el estroma (y, por tanto, el origen de la Jalea de Wharton) en su definición más amplia, comprende todas aquellas zonas del cordón umbilical que no forman parte de ninguna de las siguientes: (1a) capa amniótica (o epitelial); (2) vena umbilical; (3) arterias umbilicales; (5) zona perivascular; (7): sangre del cordón umbilical. En otras palabras, en esta definición más amplia, el estroma (y, por tanto, el origen de la Jalea de Wharton) comprende (6) la Jalea de Wharton en el lumen del cordón umbilical más (1b) la capa subamniótica (o mesenquimatosas); más (4) la zona intervacular. Preferentemente, a menos que se indique explícitamente lo contrario, la Jalea de Wharton subamniótica (1b) está comprendida en la Jalea de Wharton denominada en la presente memoria descriptiva "Jalea de Wharton estromal". Preferentemente, (4) la zona intervacular está comprendida en la Jalea de Wharton denominada en la presente memoria descriptiva "Jalea de Wharton estromal". De este modo pues, el estroma (y, por tanto, el origen de la Jalea de Wharton) en su definición más amplia, comprende todas aquellas zonas del cordón umbilical que se representan esquemáticamente como 1b, 4 y 6 en la Fig. 1. En caso de que las definiciones anatómicas que en la presente memoria descriptiva se ofrecen con respecto al cordón umbilical difieran parcial o totalmente de las definiciones contenidas en parte o en la totalidad de la bibliografía, prevalecerán las definiciones contenidas en la presente memoria descriptiva.

45 Se ha propuesto en la literatura (Davies et al., Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol. 6, p. 1620-1630) que, desde una perspectiva pragmática, solo (1a) el revestimiento del cordón y (5) la Jalea de Wharton perivascular pueden diseccionarse claramente de las regiones o zonas restantes. La presente invención contempla, en una realización, esa disección diferenciada, es decir, la separación de la Jalea de Wharton estromal de (1a) el revestimiento de la médula y (5) la zona perivascular, incluida la Jalea de Wharton perivascular.

50 La presente invención se basa en varios descubrimientos, que están interrelacionados y, por lo tanto, juntos llevan a los inventores a llegar a los diversos aspectos de la invención, que se describirán todos individualmente a continuación. Por lo tanto, los aspectos descritos en esta especificación son todos combinables entre sí, incluso si no se describen explícitamente de este modo, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Todos los aspectos de la presente invención se basan, *entre otras cosas*, en el descubrimiento de que la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical contiene células con propiedades únicas en un estado particularmente competente para la expansión, y que un procedimiento de aislamiento específico proporciona de forma fiable estas células estromales potencialmente multipotentes para que puedan mantenerse y expandirse en cultivo.

55 En el contexto de la presente invención no se destruyen ni se han destruido embriones humanos. En particular, ni el procedimiento ni la célula ni la población celular de la presente invención requieren la destrucción de un embrión humano.

Procedimiento de obtención de una célula estromal mesenquimal

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener una célula estromal mesenquimal. El procedimiento comprende (a) aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma, y (b) someter la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma a tratamiento enzimático, liberando de este modo al menos una célula de la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma.

- 5 En particular, con referencia a la Fig. 1, que representa una sección transversal del cordón umbilical (humano) y vista esquemática de secciones (áreas anatómicas) del cordón umbilical (humano), el procedimiento puede describirse como: un procedimiento para obtener una célula estromal mesenquimal, en el que el procedimiento comprende (a) aislar la Jalea de Wharton estromal (1b, 4, 6) o una fracción de la misma, y (b) someter dicha Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma a un tratamiento enzimático, liberando de este modo al menos una célula de la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma.

La célula obtenida tras la etapa (b) puede ser pluripotente o, más típicamente, multipotente. Opcionalmente, pero preferentemente, se incluyen etapas adicionales, en particular una etapa de expansión, que se describe en detalle más adelante.

- 15 En el procedimiento de la presente invención, la Jalea de Wharton se aísla de un cordón umbilical. Esto representa un cambio de paradigma con respecto a la tendencia general en la técnica, de acuerdo con la cual las células mesenquimales estromales (CEM) derivadas del estrecho óseo (MO) representan la población de CEM adultas más ampliamente estudiada y se consideran el patrón oro para las aplicaciones basadas en CEM (por ejemplo, Batsali et al., Blood, 2013 vol. 122, p. 1212). Sin embargo, la aspiración de médula ósea suele ser invasiva y dolorosa. Una gran ventaja del procedimiento de acuerdo con la presente invención sobre el aislamiento a partir de médula ósea (MO) es que el cordón umbilical está fácilmente disponible en el nacimiento de un mamífero, mientras que la cirugía necesaria para obtener médula ósea suele ser invasiva y dolorosa. Por ello, pacientes, donantes y profesionales sanitarios son reacios a utilizar CEMs derivadas de médula ósea, y probablemente lo serían aún más si sólo se dispusiera de alternativas fiables.

- 25 De este modo, es una ventaja del procedimiento de acuerdo con la presente invención que el procedimiento sea un procedimiento *ex vivo*. Preferentemente, se evita por completo la invasión de un cuerpo humano o animal vivo. De este modo, el procedimiento de la presente invención preferentemente no representa un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por medio de cirugía o terapia. De este modo, se abordan satisfactoriamente los aspectos relacionados con el dolor, los aspectos manipulativos y los aspectos éticos, en comparación con el aislamiento a partir de médula ósea descrito en la bibliografía.

- 30 Otra diferencia clave con respecto a varios estudios e informes anteriores es que, de acuerdo con la técnica anterior, las CEMs pueden aislarse eficazmente del tejido conjuntivo que rodea los vasos del cordón umbilical (por ejemplo, Batsali et al., Blood, 2013 vol. 122, p. 1212), mientras que la presente invención se basa en el aislamiento de CEMs de una zona que excluye la zona perivascular y, por tanto, la Jalea de Wharton perivascular. De este modo pues, los inventores de la presente invención han descubierto que debe seleccionarse intencionadamente una zona anatómica específica del cordón umbilical para obtener las ventajas descritas en la presente memoria descriptiva. Más concretamente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una zona anatómica específica de origen de las células y/o un seccionamiento y segmentación específicos del cordón umbilical y/o una etapa específica de aislamiento y/o opcionalmente una etapa específica de expansión, todo ello como se describe en detalle a continuación y se ilustra en los ejemplos. Es importante que las realizaciones preferentes y/u opcionales y los detalles del área anatómica específica de origen de las células, el seccionamiento y segmentación específicos del cordón umbilical, la etapa específica de aislamiento y la etapa específica opcional de expansión sean combinables entre sí de acuerdo con la presente invención en todas y cada una de las combinaciones, a menos que el contexto enseñe claramente que una combinación particular no es posible o no se desea de acuerdo con la presente invención.

- 45 En el procedimiento de la presente invención, es ventajoso un aislamiento rápido de las células estromales del cordón umbilical. En una realización preferente, las etapas (a) y (b) juntas se llevan a cabo en un tiempo total de menos de 6 horas, más preferentemente menos de 5 horas, más preferentemente menos de 4 horas y más preferentemente menos de 3 horas. Menos de 3 horas incluye intervalos de tiempo de 0,5 a 2,5 horas y de 1 a 2 horas. Es evidente que una duración corta de las etapas (a) y (b) juntas también significa que el intervalo de tiempo de duración de la propia etapa (a) es corto.

- 50 A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos, ingredientes, recipientes de cultivo, contenedores y materiales que entran en contacto directo o indirecto con las células son preferentemente estériles, y más preferentemente de grado BPF.

A continuación se describe detalladamente el procedimiento y sus realizaciones.

Origen del tejido

- 55 La primera etapa del procedimiento de acuerdo con el procedimiento de la invención es la etapa (a) caracterizada por aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma a partir de un cordón umbilical. La etapa (a) es preferentemente una etapa mecánica, es decir, normalmente no depende de etapas químicas o enzimáticas para el aislamiento. De este modo, en una realización preferente, en la etapa (a) no se añade ningún ingrediente con actividad

enzimática. Como se describirá más adelante, el tratamiento enzimático es, sin embargo, importante para la etapa posterior (b).

La palabra "fracción", cuando se utiliza en relación con la Jalea de Wharton estromal, no está particularmente limitada y generalmente significa que, en algunas realizaciones, menos del 100 % de la Jalea de Wharton estromal total de un cordón umbilical puede utilizarse en el procedimiento de la invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones puede utilizarse del 10 al 99 %, tal como del 20 al 90 %, del 30 al 80 %, del 40 al 60 %, del total de Jalea de Wharton estromal. Las razones para utilizar menos del 100 %, en algunas realizaciones, pueden ser múltiples y pueden deberse a limitaciones experimentales para recuperar el 100 % de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical, o a propósito, por ejemplo, cuando se desea utilizar parte de la Jalea de Wharton estromal para experimentos comparativos. No obstante, se desea utilizar preferentemente una fracción lo más grande posible, es decir, el 80 % o más, de la Jalea de Wharton estromal, preferentemente, el 90 % o más. Los valores en %, salvo indicación contraria, se relacionan con el % del volumen total de Jalea de Wharton estromal contenida en un cordón umbilical.

De este modo, de acuerdo con la presente invención, las células se aíslan del cordón umbilical. El cordón umbilical es de origen animal placentario, pero, preferentemente, el cordón umbilical es de origen mamífero. En los mamíferos placentarios, el cordón umbilical es una estructura que conecta la placenta con el feto en desarrollo e, inmediatamente después del nacimiento, con el recién nacido. Ni la placenta ni el recién nacido forman parte del cordón umbilical; éste se limita al tubo conjuntivo entre la placenta y el recién nacido.

El cordón umbilical se obtiene tras el nacimiento. Preferentemente, el cordón umbilical se obtiene 24 horas después del nacimiento o menos, tal como 12 horas o menos después del nacimiento, 6 horas o menos después del nacimiento, 3 horas o menos después del nacimiento, tal como 2 horas o menos después del nacimiento, y preferentemente 1 hora o menos después del nacimiento. De este modo, el cordón umbilical puede almacenarse, preferentemente durante un máximo de 24 horas, después del nacimiento, preferentemente a bajas temperaturas de 0 a 10 °C, preferentemente de 2 a 8 °C, antes del aislamiento de las células. Sin embargo, el cordón umbilical no se congela antes del aislamiento de las células. Opcionalmente, el cordón umbilical se enjuaga con agua estéril o con una solución acuosa amortiguada estéril antes del aislamiento de las células.

El cordón umbilical se mantiene y manipula preferentemente en condiciones estériles antes y durante el aislamiento de las células. Opcionalmente, el cordón umbilical puede esterilizarse adicionalmente por medio de un breve tratamiento superficial del cordón con, por ejemplo, una solución acuosa (etanol al 70 % vol./vol.) o betadine, seguido de un aclarado con agua estéril.

Preferentemente, las células se aíslan de un cordón umbilical humano. El cordón umbilical (CU) humano a término pesa aproximadamente 40 g y tiene un diámetro medio de unos 1,5 cm (Raio et al., 1999, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., vol. 83; p. 131-135). De este modo, preferentemente, el cordón umbilical utilizado de acuerdo con la presente invención es un cordón umbilical humano. Un cordón umbilical humano sometido al procedimiento de la presente invención tiene preferentemente una longitud de aproximadamente 40-65 cm, tal como 44 a 51 cm.

Típicamente, el cordón umbilical se aísla tras el nacimiento de un recién nacido sano de una madre sana, preferentemente humana. Preferentemente, dicha madre se ha abstenido de fumar, consumir alcohol y consumir fármacos psicoactivos durante al menos un mes antes del parto.

Cuando se dice que la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma se aísla a partir de un cordón umbilical, esto significa preferentemente que no se utiliza más de un cordón umbilical como material de partida. Sin embargo, también es posible que se utilice más de un cordón umbilical como material de partida. En una realización, se utiliza un cordón umbilical como material de partida en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. En esa realización, todo el material de partida es autólogo, es decir, ningún material alogénico de cordón umbilical forma parte del material de partida, y en consecuencia todas las células obtenibles por el procedimiento de la presente invención proceden de un único donante, por cada ejecución del procedimiento.

Es posible utilizar un cordón umbilical entero como material de partida, pero es igualmente posible utilizar una fracción de un cordón umbilical como material de partida. Cuando se utiliza un cordón umbilical entero como material de partida en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede decirse que el procedimiento se ejecuta a "escala completa". Por consiguiente, el procedimiento de acuerdo con un aspecto preferente de la presente invención, que comprende las etapas (a), (b) y opcionalmente (c), se denomina ejecución "a escala completa" cuando se utiliza un cordón umbilical entero como material de partida. En este contexto, la palabra "entero" no excluye que partes menores del cordón, por ejemplo, los dos extremos del cordón sean acortados o recortados y, por lo tanto, no se incluyan como material de partida; tampoco excluye que el cordón umbilical sea seccionado y/o segmentado durante el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva; más bien significa que esencialmente toda la cantidad de un cordón umbilical se utiliza como material de partida. En el caso de un cordón umbilical humano de nacimientos a término, un cordón umbilical entero suele pesar entre 35 y 40 gramos, o más exactamente unos 40 gramos. En una realización, se empieza con 35 a 45 gramos de cordón umbilical de un único donante. La cantidad de material de partida, es decir, el cordón umbilical, influye por supuesto en la cantidad total de células obtenidas durante las fases posteriores del procedimiento de acuerdo con la presente invención. A menos que se indique expresamente lo contrario, todas las cantidades (por ejemplo, el número de células) indicadas en la presente memoria descriptiva se relacionan con una

serie a escala completa. La palabra "a gran escala" no entra en conflicto con el término "fracción" de la Jalea de Wharton estromal, a condición de que se haga un esfuerzo razonable para recuperar la mayor cantidad posible de Jalea de Wharton estromal de un cordón umbilical.

- 5 La capa más externa del cordón umbilical (también denominada revestimiento del cordón, tejido del cordón o membrana de revestimiento del cordón umbilical, representada esquemáticamente como 1a en la Fig. 1), no es una fuente deseada de células en el procedimiento de la invención. Como el propio cordón umbilical es una prolongación de la placenta, la membrana que reviste el cordón umbilical es una prolongación de la membrana amniótica que reviste la placenta. La membrana de revestimiento del cordón umbilical consta de dos capas: la capa amniótica (o epitelial) (también denominada membrana de revestimiento del cordón umbilical) y la capa subamniótica (o mesenquimatosas).
- 10 El cordón umbilical humano, por ejemplo, está cubierto por una o varias capas de células epiteliales escamosas cúbicas (Copland et al., Placenta, 2002; vol. 23, p. 311-321; Mizoguchi et al., J. Dermatol. Sci., 2004, vol. 35, p. 199-206); no se desea aislar estas células en el procedimiento de la invención. En una realización del procedimiento de la invención se desea que no se aislen ni células de la capa amniótica ni células de la capa subamniótica, y por tanto que dichas células no se utilicen como material de partida en la expansión opcional posterior.
- 15 La arquitectura tisular interna del cordón umbilical está compuesta por dos arterias y una vena y una matriz circundante de tejido conjuntivo mucoso (Jalea de Wharton estromal). Se ha descrito que la Jalea de Wharton comprende células similares a fibroblastos (Parry, 1970, J. Anatomy, vol. 107, p. 505-518) y mastocitos ocasionales. Además, la Jalea de Wharton comprende una sustancia amorfa molida rica en proteoglicanos, principalmente ácido hialurónico.
- 20 Preferentemente, el cordón umbilical utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención procede de un nacimiento a término, también denominado "a término". Más concretamente, el cordón umbilical humano utilizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención procede de un nacimiento entre 38 y 42 semanas de gestación, más preferentemente entre 39 y 41 semanas de gestación. En una realización, el cordón umbilical humano procede de un parto natural (vaginal); en una realización alternativa, el cordón umbilical humano procede de un parto no natural, por ejemplo, cesárea.
- 25 En una realización, la obtención del cordón umbilical de un nacimiento humano o animal no forma parte de la presente invención. En esa realización, el procedimiento de la invención comienza después de que se haya obtenido el cordón umbilical. En otras palabras, el procedimiento de la invención se practica entonces mediante el uso de como material de partida un cordón umbilical que se ha obtenido antes de la etapa (a).

Segmentación del cordón umbilical

- 30 Además, los inventores han descubierto que es ventajoso diseccionar mecánicamente el cordón umbilical, como se describe en la presente memoria descriptiva. La disección comprende preferentemente la segmentación y el seccionamiento, bot como se describe en la presente memoria descriptiva.

- 35 En una primera etapa, es ventajoso segmentar el cordón umbilical, como se describe en la presente memoria descriptiva. La segmentación es opcional pero preferente. En particular, la segmentación facilita el manejo y la reproducción fiable de las etapas posteriores. Además, la segmentación mejora la eficacia del aislamiento de la Jalea de Wharton estromal en la etapa posterior de seccionamiento. Por lo tanto, la segmentación se produce preferentemente antes de la etapa descrita a continuación de seccionar el cordón umbilical (segmentos).

- 40 La segmentación de acuerdo con la presente invención se logra típicamente por medios físicos, tales como tijeras o un bisturí. Al segmentar el cordón, se obtienen segmentos de cordón (para la ilustración, véase, por ejemplo, el ejemplo 1). El término segmentos se utiliza en la presente memoria descriptiva para referirse a dichos cortes de cordón. Preferentemente, la segmentación es perpendicular al cordón. Perpendicular como se utiliza en la presente memoria descriptiva, con respecto al cordón umbilical, significa que la dirección del corte del cordón umbilical tiene un ángulo de aproximadamente 90 ° con respecto a la dirección del cordón. Para determinar el ángulo, el cordón se coloca preferentemente estirado, es decir, sin rizos ni dobleces. Alrededor de 90 ° significa 75 ° a 105 °, preferentemente 80 ° a 100 °, más preferentemente 85 ° a 95 °. Un artesano experto será capaz de cortar la cuerda perpendicular también en ausencia de un dispositivo para medir el ángulo, basándose en su experiencia. No obstante, si se desea, puede utilizarse un dispositivo para determinar el ángulo.
- 45

- 50 Más Preferentemente, los segmentos perpendiculares preferentemente tienen cada uno una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 cm, y más preferentemente de aproximadamente 2,5 cm. En una realización preferente, el segmento o segmentos de vasos se retiran de los segmentos del cordón umbilical antes de la etapa (b). En particular, es preferente extraer los vasos, o más precisamente segmentos de vasos, tras la segmentación -preferentemente perpendicular- del cordón umbilical.

La segmentación es opcional pero ventajosa y, por lo tanto, forma parte preferentemente del procedimiento de la invención. La segmentación se realiza preferentemente en condiciones estériles.

Seccionamiento para obtener Jalea de Wharton estromal

En general, el cordón umbilical de mamíferos, y en particular el cordón umbilical humano, muestra una compartimentación tisular en la que las características celulares y los elementos de la matriz extracelular difieren entre sí. Se han descrito al menos seis zonas o secciones distintas, basadas en los estudios estructurales y funcionales (véase también la Fig. 1): enumeradas en la presente memoria descriptiva en el orden de fuera a dentro, mientras que los números se relacionan con los números de la Fig. 1: revestimiento del cordón (compuesto por epitelio amniótico y células subamnióticas) (1), estroma (intervascular) (denominado clásicamente Jalea de Wharton estromal), estroma intervacular (4), estroma perivascular (5), vasos (2 y 3), estroma subamniótico (1b), hendiduras (no ilustradas).

En el estado de la técnica se había considerado que, dada la hipótesis de que las células perivasculares migran típicamente lejos de la proximidad de la vasculatura, la mayoría de las CEMs en la Jalea de Wharton se originan en la región perivascular (Davies et al, Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol., 6, p. 1620-1630).

Sin embargo, los inventores han llegado al sorprendente hallazgo de que un enfoque seccional es ventajoso cuando se pretende extraer CEM de la CU, y que la sección que alberga CEM con propiedades superiores es la Jalea de Wharton estromal. Los inventores descubrieron sorprendentemente que las células derivadas del estroma de la Jalea de Wharton o de una fracción del mismo tienen propiedades superiores. Por lo tanto, es una etapa esencial del procedimiento de la presente invención que se aisle la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma.

Antes del aislamiento de la Jalea de Wharton estromal es importante enjuagar el cordón, o particularmente los segmentos de cordón. Para el aclarado es adecuada una solución acuosa, idealmente amortiguada a un pH fisiológico o próximo a éste e isotónica, opcionalmente suplementada con antibióticos. Por ejemplo, solución salina amortiguada con HEPES (SSAH) o solución salina amortiguada con fosfato (SSAF), preferentemente SSAH suplementada con 300 µg/ml de gentamicina y 0,15 µg/ml de anfotericina B. El tiempo de aclarado típico puede ser preferentemente de 1 a 30 minutos, preferentemente unos 10 minutos. Durante ese tiempo, se emplea movimiento mecánico, por ejemplo agitación, para exponer adecuadamente el cordón umbilical, o preferentemente segmentos de cordón umbilical, a la solución acuosa de enjuague. Especialmente después de segmentar el cordón, el aclarado es importante porque de este modo se pueden eliminar los restos de sangre en las interfaces de los segmentos resultantes de la segmentación.

A continuación, para el aislamiento de la Jalea de Wharton estromal, preferentemente, el cordón umbilical, o muy preferentemente el segmento o segmentos del cordón umbilical, se someten a seccionamiento, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. De este modo, se obtiene la Jalea de Wharton estromal deseada. Otras formas de obtener Jalea de Wharton estromal son adecuadas como alternativa al seccionamiento descrito en la presente memoria descriptiva, y también forman parte de la descripción de la presente memoria descriptiva. Sin embargo, es preferente que la Jalea de Wharton estromal se obtenga por medio del procedimiento de seccionamiento descrito en la presente memoria descriptiva.

Para aislar la Jalea de Wharton deseada, la abertura lateral del cordón umbilical, o de segmento(s) del cordón umbilical, ha demostrado ser ventajosa. Preferentemente, el cordón umbilical, o el segmento o segmentos del cordón umbilical se cortan longitudinalmente, por ejemplo con un bisturí. Longitudinalmente significa en paralelo a la extensión del cable. Es preferente una incisión longitudinal por segmento a múltiples incisiones. La abertura lateral, o más concretamente la incisión longitudinal, permite que las distintas secciones del cordón umbilical puedan separarse posteriormente de forma eficaz, en particular que pueda aislarse la Jalea de Wharton estromal, tal como se describe a continuación.

Como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva y se ilustra en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, las células del estroma de la Jalea de Wharton demostraron ser muy ventajosas. Por lo tanto, la Jalea de Wharton que se va a seccionar y seleccionar para su procesamiento posterior en la presente invención excluye la zona perivascular y, por lo tanto, excluye cualquier Jalea de Wharton perivascular. En otras palabras, la Jalea de Wharton que debe seccionarse y seleccionarse para el tratamiento posterior es la Jalea de Wharton estromal. El hallazgo de que las células del estroma de la Jalea de Wharton aisladas de acuerdo con la presente invención son superiores es un hallazgo sorprendente de los presentes inventores. Ya se había establecido anteriormente por medio de estudios estructurales finos e inmunohistoquímicos (por ejemplo, Akerman et al., Gynecol. Endocrinol., 2002, vol. 16, págs. 299-306 y Karahuseyinoglu et al., Stem Cells, 2007, vol. 25, págs. 319-331) y estudios funcionales *in vitro* (Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, págs. 220-229; Karahuseyinoglu et al., Stem Cells, 2007, vol. 25, p. 319-331) que existen diferencias en el número y la naturaleza de las células entre las zonas subamnióticas (1b), intervacuulares (4) y perivasculares (5), y que la densidad de células en un espacio determinado difiere entre las zonas subamnióticas, intervacuulares y perivasculares: la densidad celular es considerablemente baja en las regiones subamnióticas, mientras que las zonas perivasculares poseen la mayor densidad celular (Takechi et al., 1993, Placenta; vol. 14, p. 235-245; Karahuseyinoglu et al., 2007, Stem Cells, vol. 25, p. 319-331). Obsérvese que en este párrafo el término "densidad celular" se utiliza de forma no convencional con respecto a un espacio tridimensional, mientras que el término se utiliza con respecto a un área bidimensional en el resto de esta divulgación. Por ejemplo, en estudios anteriores, las muestras adheridas a la serosa y adheridas a los vasos se habían propuesto como fuente de células estromales derivadas del cordón umbilical (por ejemplo, el documento US 2004/0136967 A1). Aunque se sabía previamente que se pueden aislar células de la Jalea de Wharton y que existen diferentes poblaciones celulares en la Jalea de Wharton, la selección específica de la Jalea de Wharton estromal de acuerdo con la presente invención es una selección más específica que los primeros enfoques publicados (por ejemplo, el documento US 2004/0136967 A1), y una selección diferente a la sugerida por otros (por ejemplo, el documento WO 2004/072273 A). Por lo tanto, el

seccionamiento previo a la extracción física es notablemente diferente de las sugerencias de la bibliografía de acuerdo con las cuales el tejido normalmente no se selecciona y secciona de forma tan crítica antes del aislamiento de las células, sino que las células deseadas se aíslan de una población celular, por ejemplo, por medio de la destrucción selectiva de las células no deseadas (selección negativa, véase, por ejemplo, el documento US 2004/0136967 A1).

5 De acuerdo con el conocimiento de los inventores de la presente invención, no se sabía específicamente que las células procedentes de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical son superiores a las células perivasculares en cuanto a homogeneidad, tamaño (volumen y área superficial, respectivamente), potencial de diferenciación y stemness. De este modo, en contraste con la idea principal de acuerdo con el estado de la técnica, los presentes inventores han descubierto que las células estromales derivadas de la Jalea de Wharton son superiores en muchos
10 aspectos. Varios de estos aspectos se ilustran en los ejemplos experimentales expuestos en la presente memoria descriptiva. En general, las poblaciones celulares con propiedades morfológicas y funcionales homogéneas pueden considerarse adecuadas para desarrollar un producto celular relativamente uniforme. Sin querer ceñirme a una teoría concreta, es posible que la uniformidad pueda atribuirse al hecho de que la Jalea de Wharton estromal suele estar compuesta por menos pericitos y células endoteliales que la zona perivascular, si es que hay alguna.

15 Los inventores han descubierto sorprendentemente que las células procedentes de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical son particularmente ventajosas. El estroma subamniótico (que comprende típicamente la Jalea de Wharton) (1b) puede obtenerse raspando la superficie interna del epitelio amniótico (1a) con un medio mecánico; sin embargo, hay que tener cuidado para evitar la ruptura o fraccionamiento del epitelio amniótico, lo que podría dar lugar a la obtención no deseada de una parte del epitelio amniótico.

20 Las ventajas incluyen la homogeneidad de las poblaciones celulares y propiedades similares a las de las células madre. En particular, en ausencia de vasos del cordón umbilical y de la zona perivascular, y por tanto de células de los vasos del cordón umbilical y de la zona perivascular, se pueden conseguir estas ventajas.

Por lo tanto, es preferente que la etapa (a) aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma del cordón umbilical comprenda el seccionamiento del cordón umbilical o de segmentos del mismo. Preferentemente, comprende
25 el seccionamiento de segmentos del cordón umbilical. Durante la etapa de seccionamiento, la Jalea de Wharton estromal deseada se separa de los vasos con la zona perivascular, que puede comprender la Jalea de Wharton perivascular. Durante la etapa de seccionamiento, la Jalea de Wharton estromal también se separa de al menos el epitelio amniótico. Hay que tener cuidado para evitar la rotura o el fraccionamiento del epitelio amniótico, que podría dar lugar a la obtención no deseada de una parte del epitelio amniótico.

30 El seccionamiento se realiza preferentemente en condiciones estériles.

El seccionamiento es una parte esencial de la etapa (a) del procedimiento de acuerdo con la presente invención, es decir, de la etapa de aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma de un cordón umbilical. De este modo, en una realización, el aislamiento de la Jalea de Wharton estromal o de una fracción de la misma a partir del
35 cordón umbilical se consigue sometiendo el cordón umbilical a una separación física, en la que se descartan los vasos y la zona perivascular del cordón umbilical y al menos la capa amniótica del revestimiento del cordón, y se conserva la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma.

Para el seccionamiento, o más precisamente el seccionamiento por extracción mecánica, ha demostrado ser muy ventajoso que el cordón umbilical haya sido previamente segmentado como se ha descrito anteriormente, y
40 adicionalmente incidido longitudinalmente, como se ha descrito anteriormente. De este modo, en una realización preferente de la presente invención, la etapa (a) del procedimiento comprende tanto una etapa de segmentación, como se ha descrito anteriormente, y una etapa de seccionamiento, como se describe en la presente memoria descriptiva.

Una forma adecuada de aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma a partir de un cordón umbilical comprende la extracción de los vasos sanguíneos y de la zona perivascular del cordón umbilical. Convenientemente,
45 la zona perivascular, que se ha propuesto en la literatura que comprende la Jalea de Wharton perivascular, también está separada del revestimiento del cordón, en particular al menos de la capa amniótica del revestimiento del cordón.

De este modo, el seccionamiento de acuerdo con la presente invención se caracteriza por la eliminación física de los vasos y de la zona perivascular del cordón umbilical. De acuerdo con la presente invención, los vasos y la zona
50 perivascular pueden eliminarse antes de la etapa (a) o como parte de la etapa (a), lo cual es preferente. Una forma técnicamente ventajosa de extraer los vasos y la zona perivascular, que es preferente en la presente invención, se caracteriza por despojar los vasos y la zona perivascular del cordón umbilical. Por ejemplo, los vasos sanguíneos del cordón umbilical (dos venas y una arteria) se extraen con unas pinzas estériles.

Los inventores han observado que la extirpación de los vasos, por ejemplo tirando de ellos, también elimina la zona perivascular. En una realización preferente, la zona perivascular se elimina en su totalidad; esto significa que no
55 quedan células pertenecientes a la zona perivascular en el cordón (segmentos) una vez que se han eliminado los vasos. Cualquier otro procedimiento es igualmente adecuado, a condición de que se elimine por completo la zona perivascular. La zona proximal a la pared externa de la vasculatura umbilical es la zona perivascular. La zona perivascular se encuentra normalmente en una zona que se extiende a unos 3 mm o menos de la pared externa de los vasos. La zona perivascular se elimina junto con los vasos cuando éstos se extirpan. La Jalea de Wharton que

pueda encontrarse en la zona perivascular proximal a la pared externa de la vasculatura umbilical puede denominarse Jalea de Wharton perivascular. La Jalea de Wharton perivascular suele encontrarse en una zona que se extiende hasta unos 3 mm o menos de la pared externa de los vasos. La Jalea de Wharton perivascular se elimina junto con los vasos al extirparlos.

5 De este modo, en una realización preferente, los vasos son extraídos del cordón umbilical, o del segmento o segmentos del cordón umbilical. La extracción puede realizarse agarrando el vaso o vasos por medios mecánicos, tal como pinzas o cualquier otro medio adecuado para tal fin, y tirando del vaso o vasos hacia fuera. Preferentemente, los vasos se extraen uno tras otro, pero no es un requisito estricto. Mientras se extraen los vasos, se suele fijar el cordón umbilical o un segmento del mismo, por ejemplo, sujetándolo con un medio mecánico, tal como unas pinzas o cualquier otro medio adecuado para ello. De este modo, se puede aplicar una fuerza mecánica y retirar los vasos. La extirpación debe realizarse con cuidado, en el sentido de que debe evitarse la apertura de los vasos y/o la pérdida de células vasculares o perivascuales. La extracción debe realizarse con cuidado, en el sentido de que debe evitarse arrancar la matriz del cordón o, alternativamente, reducirla al mínimo.

10 Preferentemente, después de la etapa de extracción de los vasos, el cordón umbilical, o el segmento o segmentos respectivos, se vuelven a examinar ópticamente para asegurarse de que los vasos (y por lo tanto también el PVJW) se han extraído completamente.

15 Los vasos, incluyendo cualquier tejido que se adhiera a ellos después de ser despojados, son desechados. Esto significa que los vasos, incluido cualquier tejido que se adhiera a ellos después de su extracción, no se someten a la fase posterior de tratamiento enzimático. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la zona perivascular Jalea de Wharton no se utiliza como fuente para el aislamiento de células. Por lo tanto, no se utiliza la Jalea de Wharton perivascular como fuente para el aislamiento de las células. A título ilustrativo, en las Figs. 1 y 2 se muestra la Jalea de Wharton perivascular (5 en la Fig. 1).

20 De acuerdo con la presente invención, los vasos y el área alrededor de los vasos se desechan. El área alrededor de los vasos es de al menos unos 2,0 mm de diámetro, por lo que la medición se extiende desde la superficie exterior del vaso hacia fuera (véase la Fig. 2), tal como 2,0 mm de diámetro, preferentemente, 2,5 mm, y más preferentemente 3,0 mm. Por lo tanto, al menos unos 2,0 mm, tales como 2,0 mm, preferentemente, 2,5 mm, y más preferentemente 3,0 mm alrededor de los vasos del cordón umbilical no se utilizan como material de partida para el aislamiento de células de acuerdo con la presente invención. Una forma preferente de lograr esto es la extracción física ("atado") de los vasos del cordón umbilical, o más precisamente, de los segmentos de vasos de los segmentos de cordón umbilical, como se describe en la presente memoria descriptiva. De este modo, en una realización preferente, los vasos se extraen físicamente del cordón umbilical, o segmentos de vasos se extraen físicamente de segmentos del cordón umbilical. Es preferente esta última opción, que requiere segmentar el cordón umbilical como se describe en la presente memoria descriptiva antes de extraer los vasos de los segmentos.

25 Ahora que los vasos y el área perivascular han sido removidos, la Jalea de Wharton estromal es obtenida del cordón umbilical libre de vasos, o de secciones de cordón umbilical libres de vasos, como sigue: Preferentemente, el aislamiento del estroma de Wharton o de una fracción del mismo se caracteriza adicionalmente por una etapa de separación física del estroma subamniótico (1b) de la membrana de revestimiento del cordón umbilical (1a). Esto puede incluir la separación de la Jalea de Wharton de la membrana de revestimiento del cordón umbilical, particularmente al menos de la capa epitelial de la membrana de revestimiento del cordón umbilical. De este modo, se obtiene estroma (que comprende Jalea de Wharton estromal) libre del material de revestimiento del cordón respectivo. Preferentemente, la etapa de separar físicamente el estroma (posiblemente incluyendo la Jalea de Wharton) de la membrana de revestimiento del cordón umbilical, particularmente al menos de la capa epitelial de la membrana de revestimiento del cordón umbilical, también se realiza en los segmentos que se pueden obtener como se ha descrito anteriormente. Por razones prácticas, la etapa se realiza normalmente segmento a segmento (es decir, un segmento tras otro), aunque es preferente la realización rápida de esta etapa.

30 La Jalea de Wharton estromal típicamente tiene una consistencia gelatinosa relativamente suelta; por lo tanto, puede ser disecada mecánicamente del cordón umbilical sin vasos, o preferentemente de segmentos de cordón umbilical sin vasos.

35 La disección mecánica se caracteriza preferentemente por el raspado. Para el raspado puede utilizarse cualquier herramienta, preferentemente mecánica, adecuada o diseñada para tal fin. La eliminación se realiza preferentemente por medios mecánicos; en la técnica se han descrito medios mecánicos adecuados, por ejemplo en los documentos US20080181967 A1, WO2008146992 A1 y WO2007080591 A2. En una realización, se utiliza un medio mecánico para recortar trozos de tejido matriz de los segmentos UC. En una realización, la superficie interior del cordón (segmentos) se raspa con un medio mecánico. En una realización, la membrana epitelial amniótica se retira mecánicamente, por ejemplo, con un medio mecánico. Si el raspado se realiza con cuidado, que es lo preferente, no se daña la capa epitelial y, por tanto, no se obtienen células de la capa epitelial por raspado.

40 Es importante no incluir trozos de la membrana epitelial amniótica al recoger el tejido matriz. Para ello, debe evitarse o reducirse al mínimo el corte del revestimiento del cordón umbilical. En particular, la separación física de la Jalea de Wharton estromal de la membrana de revestimiento del cordón umbilical se caracteriza preferentemente por el raspado

de la Jalea de Wharton, preferentemente sin diseccionar mecánicamente el revestimiento del cordón umbilical, o disecando el revestimiento del cordón sólo en una medida mínima. "disección mecánica" incluye cortar, apretar o afectar de otro modo a la integridad del tejido por medio de la aplicación de fuerza mecánica. En una realización preferente, "una extensión mínima" consiste en una única incisión longitudinal, preferentemente paralela a la dirección del cordón. De este modo, el cordón, o segmento del cordón, según sea el caso, se abre lateralmente, proporcionando así acceso al interior del cordón.

Opcionalmente, tampoco se obtienen células de la capa subamniótica. Para ello, el raspado debe realizarse con sumo cuidado, sin ejercer una fuerza mecánica indebida cerca de la membrana de revestimiento del cordón umbilical. En esta realización, no se desea todo el revestimiento del cordón (que comprende la capa amniótica y la capa mesenquimal subamniótica).

En cualquier caso, no se desea la capa amniótica (epitelial). Cualquier material de revestimiento del cordón no deseado que quede tras la extracción mecánica de la Jalea de Wharton estromal deseada se desecha.

De este modo, se obtiene tejido estromal de Jalea de Wharton.

Basándose en las propiedades ventajosas de las células aisladas de acuerdo con la presente invención, los inventores concluyen, sin querer por ello estar vinculados a ninguna teoría en particular, que las células menos maduras con una capacidad beneficiosa para proliferar se localizan relativamente más lejos de los vasos y, por tanto, más cerca de la superficie amniótica, mientras que las células más diferenciadas se encuentran más cerca de los vasos umbilicales. En conclusión, los inventores han seleccionado el estroma de la Jalea de Wharton como región de origen para el aislamiento de células de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferente, la etapa (a) de aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma de un cordón umbilical comprende la etapa de seccionar como se describe en la presente memoria descriptiva y la etapa de picar como se describe a continuación.

En una realización más preferente, la etapa (a) de aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma de un cordón umbilical comprende la etapa de segmentar como se describe anteriormente, la etapa de seccionar como se describe en la presente memoria descriptiva y también la etapa de picar como se describe a continuación.

Reducción del tamaño de los fragmentos de tejido por medio de tratamiento mecánico

Preferentemente, la Jalea de Wharton estromal obtenida por seccionamiento se somete posteriormente a un tratamiento mecánico cuyo objetivo es disminuir el tamaño de los fragmentos de tejido. El tratamiento mecánico tiene por objeto diseccionar los enlaces físicos dentro de la Jalea de Wharton estromal, de forma que se reduzca el tamaño de los trozos de Jalea de Wharton estromal. El tratamiento mecánico es ventajoso con respecto al tratamiento enzimático posterior, como se describe a continuación. Un tamaño relativamente pequeño y relativamente uniforme de los fragmentos de Jalea de Wharton estromal se asocia con varias ventajas: se asocia con un área de superficie aumentada y, por lo tanto, se entiende que hace que el material sea accesible a la(s) enzima(s) utilizada(s) para el tratamiento enzimático, y permite que el lisado de plaquetas, que se entiende que contiene factores de crecimiento y otros elementos adecuados para las CEM, esté en estrecha proximidad con sustancialmente toda la Jalea de Wharton aislada.

Preferentemente, el tratamiento mecánico se lleva a cabo picando finamente los fragmentos con tijeras afiladas y/o bisturí, pero cualquier otro medio adecuado para la disminución mecánica de los fragmentos es adecuado, siempre y cuando las células no sean sustancialmente dañadas o destruidas mecánicamente. Por ejemplo, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania) dispone de los instrumentos correspondientes. En cualquier caso, el tratamiento mecánico se realiza preferentemente en condiciones estériles.

El tejido tratado mecánicamente (por ejemplo, picado) se añade opcionalmente a una solución acuosa y se dispersa en ella, para evitar que dicho tejido se seque. Es una solución acuosa, idealmente amortiguada a un pH fisiológico o próximo a él e isotónica, opcionalmente suplementada con antibióticos. Por ejemplo, es adecuada la solución salina amortiguada con HEPES (SSAH) o la solución salina amortiguada con fosfato (SSAF), preferentemente la SSAH. Opcionalmente, la solución acuosa comprende antibióticos a concentraciones adecuadas.

Preferentemente, el tejido tratado mecánicamente (por ejemplo, picado) se recibe (agrupa) posteriormente en una placa estéril adecuada, tal como una placa de Petri. Tras el aislamiento del tejido, y antes de la digestión enzimática, que se describirá más adelante, el peso total de tejido picado que se puede obtener en una serie a escala completa es normalmente de 14 gramos o más, como 16 gramos o más o 18 gramos o más.

Tratamiento enzimático

De acuerdo con la presente invención, las células se liberan del cordón umbilical o de segmentos del mismo o de secciones del mismo o de tejido picado obtenido del mismo por medio de tratamiento enzimático. A diferencia de enseñanzas anteriores (por ejemplo, Conconi et al., 2011, Open Tissue Engineer. Regen. Med. J., vol. 4, págs. 6-20), los presentes inventores descubrieron que ese tratamiento enzimático, en particular cuando se lleva a cabo en las

condiciones descritas como preferibles en la presente memoria descriptiva, es decir, condiciones suaves, produce ventajosamente CEMs que no se caracterizan por el daño celular.

La realización de tejido picado es preferente. De este modo, preferentemente, las células se liberan por medio de tratamiento enzimático a partir de tejido picado obtenido del cordón umbilical o de segmentos o secciones del mismo.

5 En particular, en la etapa (b) del procedimiento de la invención, la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma se somete a tratamiento enzimático, liberando de este modo al menos una célula de la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma. Normalmente, se libera una multitud de células. La Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma se somete a digestión enzimática. En particular, las células se liberan de la Jalea de Wharton estromal, que es una sección específica del cordón umbilical, y que se puede obtener durante la etapa precedente (a), tal como se ha descrito anteriormente. La etapa del procedimiento de acuerdo con la presente invención que comprende el tratamiento enzimático puede denominarse "tratamiento enzimático", "digestión enzimática", o similar, o simplemente "etapa (b)".

15 El tratamiento enzimático puede ocurrir opcionalmente en paralelo y/o posteriormente al aislamiento físico de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical; sin embargo, es preferente que sea posterior. Más concretamente, es preferente que la etapa (b) del procedimiento de la invención sea posterior a la etapa (a) del procedimiento de la invención. En esa realización, la etapa (b) es la única etapa del procedimiento de acuerdo con la presente invención en el que se añade actividad enzimática.

20 El enfoque de la presente invención, que se caracteriza por la liberación de las células del tejido del cordón umbilical, en concreto, de la Jalea de Wharton estromal, es notablemente diferente de los enfoques del estado de la técnica en los que el tejido del cordón umbilical se cultiva como tal, y las células crecen fuera del tejido, por ejemplo, como resultado de la migración del mismo o de la división celular, o ambas cosas (US 2004/0136967 A1). De acuerdo con la presente invención, sin embargo, la al menos una célula, o preferentemente la mayoría de las células contenidas en la Jalea de Wharton estromal, es/son liberada/s por tratamiento enzimático en lugar de por migración de la misma o división celular. Esto proporciona una mejora temporal significativa para el aislamiento: en lugar de varios días (por ejemplo, 2004/0136967 A1), las células pueden aislarse del cordón umbilical en unas pocas horas, como se describe en detalle más adelante.

25 El tratamiento enzimático es un tratamiento en el que las células se liberan del cordón umbilical o de segmentos o secciones del mismo por medio de tratamiento con al menos una enzima. Una enzima adecuada es una proteasa. De este modo, las células se liberan preferentemente del cordón umbilical o de segmentos del mismo por medio de tratamiento con al menos una proteasa. Una proteasa (también llamada peptidasa o proteinasa) es cualquier enzima que realiza la proteólisis; el catabolismo de las proteínas por hidrólisis de los enlaces peptídicos. Preferentemente, la proteasa es capaz de digerir al menos una proteína de la matriz extracelular, preferentemente colágeno. Más preferentemente, el tratamiento enzimático de la etapa (b) es un tratamiento que comprende la exposición a la enzima colagenasa. En otras palabras, la al menos una proteasa es preferentemente una colagenasa. Opcionalmente, pueden estar presentes otras proteasas. En una realización, esencialmente ninguna otra proteasa que la colagenasa está presente. por "esencialmente ninguna otra proteasa" se entiende que el preparado de colagenasa que se añade se ha purificado al máximo grado razonablemente posible y/o que la actividad de otras proteasas en el preparado de colagenasa no puede detectarse por procedimientos normales de laboratorio.

30 Una enzima particularmente adecuada y por tanto preferente para la extracción de acuerdo con la presente invención es la colagenasa (EC 3.4.24.7). El término "colagenasa" se relaciona con una actividad enzimática capaz de romper (más concretamente hidrolizar) los enlaces peptídicos de la proteína colágeno de la matriz extracelular. El colágeno está presente en la matriz extracelular de diversos tejidos, incluido el cordón umbilical. La colagenasa ayuda a destruir las estructuras extracelulares. La colagenasa está disponible tanto de origen eucariota como procariota, aunque en la presente memoria descriptiva es preferente la proteasa de origen procariota, particularmente de bacterias tal como *Clostridium* sp. La colagenasa puede aislarse de su fuente natural o producirse de forma recombinante, por ejemplo en *E. coli*. En algunas realizaciones, es preferente la colagenasa de su fuente natural, por ejemplo, *Clostridium* sp. Por ejemplo, la colagenasa puede ser de *Clostridium histolyticum*.

35 A menos que el contexto indique lo contrario, "colagenasa" se relaciona en la presente memoria descriptiva con la actividad enzimática, mientras que "preparado de colagenasa" se relaciona con un producto, comercial o no, que comprende actividad de colagenasa. La actividad de la colagenasa la proporciona la enzima colagenasa -pura o no-presente en el preparado de colagenasa.

40 Las preparaciones de colagenasa están disponibles comercialmente. En algunas realizaciones, la preparación de colagenasa utilizada es estéril o de grado BPF. Preferentemente, el preparado de colagenasa es el preparado de colagenasa NB4 o el preparado de colagenasa NB5 o el preparado de colagenasa NB6, todos ellos de SERVA (Heidelberg, Alemania) o cualquier otro preparado de colagenasa equivalente a cualquiera de ellos. La equivalencia puede determinarse ejecutando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2A, en paralelo con la preparación de colagenasa NB4/NB6 y con la preparación de colagenasa para la que se desea determinar la equivalencia, opcionalmente en un experimento de valoración para determinar la actividad de digestión de colágeno equivalente.

Opcionalmente, el preparado de colagenasa utilizado no comprende ninguna actividad enzimática distinta de la actividad de colagenasa. En particular, es preferente que no haya actividad hialuronidasa. En otras realizaciones, la actividad hialuronidasa está presente. Anteriormente se había informado de que la combinación de colagenasa con hialuronidasa puede ser ventajosa (por ejemplo, Bailey et al., Tissue Eng., 2007, vol. 13, p. 2003-2010). En los ejemplos experimentales de la presente invención, sin embargo, se obtuvieron resultados satisfactorios sin añadir hialuronidasa. Por lo tanto, en la presente invención es preferente que no haya actividad hialuronidasa añadida durante la digestión enzimática.

En algunas realizaciones no está presente ninguna proteasa que no sea colagenasa. En otras realizaciones, la actividad de una o más proteasas no colagenasas está presente. Otras proteasas pueden ser proteasas específicas o inespecíficas, endo- o exo-peptidasas. De este modo, opcionalmente, pueden utilizarse otras actividades enzimáticas, tal como otras proteasas en particular, además de la colagenasa. Estas otras actividades enzimáticas pueden estar presentes en el preparado de colagenasa o añadirse por separado. Por ejemplo, puede estar presente la clostripina (EC 3.4.22.8, también denominada clostridiopeptidasa B, proteinasa B del clostridium histolyticum, alfa-clostridipaina, clostridiopeptidasa, endoproteinasa Arg-C), una proteinasa que escinde proteínas en el enlace carboxipéptido de la arginina, o un equivalente. En otro ejemplo no excluyente puede estar presente la caseinasa c (EC 3.4.24). En otra realización no mutuamente excluyente puede estar presente la tripsina (EC 3.4.21.4), una serina proteasa.

Opcionalmente, el preparado de colagenasa utilizado no comprende ninguna actividad enzimática distinta de la actividad proteolítica, es decir, actividad colagenasa y actividad proteolítica no colagenasa. En una realización, sin embargo, el tratamiento enzimático se realiza en presencia adicional de hialuronidasa, pero hialuronidasa; esto es meramente opcional.

De manera adecuada, se prepara una solución acuosa que comprende agua y la enzima para la digestión, es decir, la proteasa, más específicamente la colagenasa, y opcional pero preferentemente un agente amortiguador. El agente amortiguador garantiza que el pH se encuentre en el intervalo deseado. Puede utilizarse cualquier agente amortiguador adecuado para amortiguar el pH en el intervalo deseado.

La solución acuosa que comprende la enzima, el agente amortiguador, el agua y, opcionalmente, otros ingredientes, se denomina Amortiguador de Digestión. En algunas realizaciones, el Amortiguador de Digestión no contiene un agente quelante de metales como EDTA o EGTA.

Preferentemente, el Amortiguador de Digestión tiene un pH de 6,0 a 9,0, más preferentemente de 7,0 a 8,0. No sólo está cerca del pH fisiológico, sino que también se ha descrito que las enzimas adecuadas tienen un pH óptimo en el intervalo de pH 7,0 a pH 8,0. De este modo pues, la digestión se realiza preferentemente en ese intervalo de pH, que se determinará preferentemente a la temperatura a la que vaya a producirse la digestión.

Opcionalmente, los iones de calcio están presentes en el Amortiguador de Digestión; por ejemplo, una sal de calcio soluble en agua, como el cloruro de calcio, se puede añadir durante la preparación del Amortiguador de Digestión. Por ejemplo, cuando el tratamiento enzimático es un tratamiento con colagenasa, la presencia de iones de calcio es beneficiosa y, por tanto, preferente.

Opcionalmente, la heparina está presente en el Amortiguador de Digestión. Se sabe que la heparina es un aditivo adecuado para las composiciones líquidas que contienen lisado de plaquetas para evitar la obstrucción (por ejemplo, Lohmann et al., 2012, PLoS ONE, vol. 7e37839). Las concentraciones adecuadas de heparina en el Amortiguador de Digestión de acuerdo con la presente invención son de 0,1 a 100 U/mL, como por ejemplo de 1 a 10 U/mL, por ejemplo 2 U/mL de heparina. Los mL se relacionan con volumen total del Amortiguador de Digestión. Una unidad de heparina (la "unidad Howell") es una cantidad aproximadamente equivalente a 0,002 mg de heparina pura, que es la cantidad necesaria para mantener 1 ml de fluido de sangre de gato durante 24 horas a 0 °C ("Online Medical Dictionary", 2000, Centre for Cancer Education).

Para iniciar la digestión, se añade el Amortiguador de Digestión al tejido a digerir - o viceversa. Es importante que la solución acuosa que contiene enzimas, es decir, el Amortiguador de Digestión, y el tejido se mezclen. Preferentemente, el conjunto de Amortiguador de Digestión y tejido se agita inmediatamente con suavidad para asegurar una mezcla adecuada. Por adición, se inicia el tratamiento enzimático.

Preferentemente, el tejido estromal derivado de la Jalea de Wharton previamente aislado y el Amortiguador de Digestión se mezclan en una proporción definida. Esto se asocia, *entre otras cosas*, con las ventajas de la reproducibilidad del procedimiento y la digestión en condiciones suaves, si se desea.

Radio = X mg tejido / 1 ml Amortiguador de Digestión

Como el tejido picado, inmediatamente antes de ser mezclado con el Amortiguador de Digestión, se almacena opcionalmente en una solución salina amortiguada (preferentemente solución salina amortiguada con HEPES, SSAH), para evitar que el tejido se seque, la proporción definida, en esa realización, se define como sigue:

Radio = X mg (tejido + solución salina amortiguada) / 1 ml Amortiguador de Digestión

(La "solución salina amortiguada" no debe confundirse con el "Amortiguador de Digestión". La "solución salina amortiguada" no contendrá normalmente ninguna enzima digestiva, en particular ninguna colagenasa)

5 En ambas fórmulas anteriores, X se encuentra convenientemente en el intervalo de 10 a 1.000, preferentemente de 50 a 500, más preferentemente de 80 a 200, y lo más preferentemente esencialmente 100. De este modo, en una realización preferente, 100 mg de tejido picado/SSAH se mezclan con 1 mL de Amortiguador de Digestión.

10 A menos que se indique lo contrario, el tratamiento con colagenasa se realiza típicamente a una temperatura entre 35 y 39 °C, más preferentemente entre 36 y 38 °C, y más preferentemente a unos 37 °C. De este modo, preferentemente, la digestión enzimática se realiza a una temperatura de 35-39 °C, tal como 38-38 °C, preferentemente 37 °C. El tejido procedente del cordón umbilical, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, se somete a tratamiento con colagenasa durante un intervalo de tiempo determinado (duración). En la presente memoria descriptiva se describen intervalos de tiempo adecuados.

Preferentemente, la digestión enzimática se realiza bajo agitación. Por ejemplo, se ha comprobado que una agitación suave y constante a aprox. 50 a 100 rpm, por ejemplo en un agitador orbital, es adecuada para la digestión.

15 En una realización muy preferente, la digestión con proteasa se lleva a cabo en condiciones suaves. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que, en una realización, un tiempo de digestión de 1 hora es adecuado. En términos más generales, contrariamente a lo sugerido en algunos estudios anteriores, las condiciones relativamente suaves son adecuadas para la digestión en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Entre los estudios anteriores, los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229 pueden mencionarse a título ilustrativo: de acuerdo con el documento WO 2004/072273 A, se recomienda utilizar una colagenasa de origen y concentración no especificados en una concentración de, por ejemplo, 0,1 mg/ml o 1 mg/ml; el tiempo de digestión de la colagenasa recomendado es de 12 a 36 horas, por ejemplo unas 24 horas; de acuerdo con Sarugaser et al. (*supra*), se utiliza 1 mg/ml de colagenasa de Sigma, C-0130); el tiempo de digestión de la colagenasa es de 18 a 24 horas. De este modo, las condiciones suaves utilizadas en el contexto de la presente invención se distinguen de las condiciones descritas por estudios anteriores.

20 "Condiciones suaves" o sinónimamente "condiciones suaves", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que al menos dos, pero más preferentemente las tres de las condiciones (1) tiempo de digestión, (2) actividad enzimática y (3) lisado de plaquetas son como se describe a continuación. La actividad enzimática está relacionada, por supuesto, con el tipo de enzima utilizada y la cantidad de enzima utilizada, en relación con el volumen en el que se utiliza (concentración de enzima) o en relación con la cantidad de tejido que debe digerirse.

30 A menos que el contexto indique lo contrario, todas las realizaciones de (1) tiempo de digestión, (2) actividad enzimática y (3) lisado de plaquetas son combinables entre sí. Por lo tanto, en general, los factores que contribuyen a las condiciones leves: corto tiempo de digestión enzimática, baja concentración enzimática y, presencia de LPh.

35 En una realización, el tiempo de digestión enzimática corto, como se describe a continuación, se combina con una actividad enzimática baja, como se describe a continuación. Las realizaciones preferentes de tiempo corto de digestión enzimática, como se describe a continuación, también pueden combinarse con realizaciones preferentes de baja actividad enzimática, como se describe a continuación.

40 En una realización, el tiempo corto de digestión enzimática, como se describe a continuación, se combina con la presencia de lisado de plaquetas, como se describe a continuación. Las realizaciones preferentes de tiempo corto de digestión enzimática, como se describe a continuación, también pueden combinarse con las realizaciones preferentes de lisado de plaquetas, como se describe a continuación.

45 En una realización, la baja actividad enzimática, como se describe a continuación, se combina con la presencia de lisado de plaquetas, como se describe a continuación. Las realizaciones preferentes de baja actividad enzimática, como se describe a continuación, también pueden combinarse con realizaciones preferentes de lisado de plaquetas, como se describe a continuación.

50 En una realización particularmente preferente, el tiempo de digestión enzimática corto, como se describe a continuación, se combina con una actividad enzimática baja, como se describe a continuación, y también con la presencia de lisado de plaquetas, como se describe a continuación. Las realizaciones preferentes de tiempo corto de digestión enzimática, como se describe a continuación, de realizaciones preferentes de baja actividad enzimática, como se describe a continuación, y las realizaciones preferentes de lisado de plaquetas, como se describe a continuación, pueden combinarse entre sí. Esta realización se muestra en el ejemplo 2A.

55 Variaciones de los valores exactos de (1) tiempo de digestión indicado en la presente memoria descriptiva, (2) actividad enzimática indicada en la presente memoria descriptiva y (3) lisado de plaquetas indicado en la presente memoria descriptiva son también posibles sin apartarse de la presente invención. Por ejemplo, puede ser posible reducir el tiempo de digestión indicado en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, en un 50 %, junto con aumentar la

actividad enzimática indicada en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, en un 50 %. El experto puede prever y poner en práctica tales variaciones basándose en su experiencia general, y en la observación cinética enzimática general de que una actividad enzimática menor puede seguir siendo suficiente para digerir una cantidad dada de sustrato cuando el tiempo de digestión aumenta en consecuencia, y *viceversa*. Por ejemplo, puede ser posible
 5 aumentar el tiempo de digestión indicado en la presente memoria descriptiva, por ejemplo en un 50 %, junto con la reducción de la actividad enzimática indicada en la presente memoria descriptiva, por ejemplo en un 50 %. Las distintas afecciones pueden seguir denominándose afecciones leves. Normalmente, la colagenasa no es autocatalítica, por lo que son posibles variaciones sin que se produzca normalmente una reducción de la cantidad de colagenasa durante la digestión a lo largo del tiempo.

10 Aplicando condiciones suaves, se puede evitar en gran medida que las CEM que se van a aislar resulten gravemente dañadas. Las condiciones suaves permiten obtener fracciones mucho más altas de células viables que los procedimientos disponibles anteriormente.

Aunque el procedimiento de la presente invención, en realizaciones típicas, produce un menor número de células totales que un procedimiento de referencia (ver Fig. 4 B y 4C), las células aisladas de acuerdo con el procedimiento de la invención se caracterizan en realizaciones típicas por un bajo porcentaje de células apoptóticas (ver Fig. 4 B y 4D). Esto es ventajoso, por ejemplo, para la ampliación opcional, que se describirá más adelante.

(1) Los presentes inventores han descubierto que los tiempos cortos de digestión enzimática son ventajosos en el procedimiento de la invención. En un ejemplo encontrado inicialmente por los presentes inventores, un tiempo corto de digestión enzimática es de 1 hora. Basado en ello, en términos generales, en una realización preferente, la etapa (b) se lleva a cabo en un tiempo total de menos de 5 horas, más preferentemente menos de 4 horas y más preferentemente menos de 3 horas. Menos de 3 horas incluye intervalos de tiempo de 0,5 a 2,5 horas y de 1 a 2 horas, y cualquier intervalo de tiempo con un límite superior inferior a 3 horas, como 2,5 horas, 2,6 horas, 2,7 horas, 2,8 horas, 2,9 horas y 2,95 horas. Todos estos intervalos de tiempo pueden denominarse "rápidos" o "cortos", aunque "rápido" y "corto" también son términos relativos, por ejemplo, 2
 20 horas es, por supuesto, más rápido/corto que 4 horas. La realización rápida del tratamiento enzimático evita problemas de deshidratación y otros posibles problemas asociados a la exposición de las células a un entorno no natural durante largos periodos de tiempo; una realización rápida del tratamiento enzimático también supera las dificultades descritas por Seshareddy et al. (2008, Meth. Cell Biol., vol. 86, p. 101-119).

Se ha sugerido que intervalos cortos de tiempo de tratamiento enzimático pueden ser ventajosos particularmente en el caso de una co-digestión con hialuronidasa y colagenasa (Can et al., Stem Cells, 25:2886-2895, 2007). Sorprendentemente, en la presente invención, los tiempos de tratamiento cortos también son beneficiosos en ausencia de hialuronidasa. Esto es notable en dos sentidos: en primer lugar, en ausencia de hialuronidasa normalmente no se esperaría que se produjera ningún efecto indeseado de la hialuronidasa, tal como la digestión extensiva no deseada del entorno extracelular de las superficies celulares finales; en segundo lugar, sin querer estar atado a ninguna teoría en particular, se entiende que la colagenasa sola actúa únicamente sobre la matriz extracelular, no sobre las células
 35 deseadas en sí. No obstante, las ventajas de un tratamiento suave, incluida la corta duración del mismo, sobre la viabilidad celular son bastante notables. En una realización, la digestión enzimática es una digestión enzimática en condiciones suaves sin ninguna hialuronidasa añadida. En una realización, la digestión enzimática es una digestión enzimática en condiciones suaves en ausencia de hialuronidasa. En una realización preferente, la etapa (b) se lleva a cabo en un tiempo total de menos de 5 horas, más preferentemente menos de 4 horas y más preferentemente menos de 3 horas, y sin ninguna hialuronidasa añadida, o preferentemente en ausencia de hialuronidasa.

Idealmente, ambas etapas (a) y (b) se realizan rápidamente. De este modo, se pueden obtener células del cordón umbilical en poco tiempo. Esto representa una ventaja con respecto a algunos estudios anteriores, que dependían o bien de amplios intervalos de tiempo para la digestión enzimática del tejido del cordón umbilical, o bien del crecimiento de células a partir del tejido del cordón umbilical, o bien de ambas cosas. En una realización preferente, las etapas (a) y (b) juntas se llevan a cabo en un tiempo total de menos de 6 horas, más preferentemente menos de 5 horas, más preferentemente menos de 4 horas y más preferentemente menos de 3 horas. Menos de 3 horas incluye intervalos de tiempo de 0,5 a 2,5 horas y de 1 a 2 horas, y cualquier intervalo de tiempo con un límite superior inferior a 3 horas, como 2,5 horas, 2,6 horas, 2,7 horas, 2,8 horas, 2,9 horas y 2,95 horas. Es evidente que una duración corta de las etapas (a) y (b) juntas también significa que la duración de la propia etapa (b) es corta. Los presentes inventores han descubierto que en una realización es ventajoso un tiempo de digestión de aproximadamente 1 hora.

(2) Los inventores también han descubierto que la cantidad de actividad enzimática es importante. La actividad enzimática está relacionada, por supuesto, con el tipo de enzima utilizada y la cantidad de enzima utilizada, en relación con el volumen en el que se utiliza (concentración de enzima) o en relación con la cantidad de tejido que debe digerirse.

55 En particular, los inventores han demostrado que la cantidad de actividad de la colagenasa es importante. A efectos de la descripción de la presente invención, la actividad de la colagenasa se indica en unidades Wünsch. 1 unidad (U) de acuerdo con Wünsch (unidad Wünsch, o unidad PZ) cataliza la hidrólisis de 1 μmol de 4-fenilazobencilocarbonil-L-prolil-L-leucilglicil-L-prolil-D-arginina por minuto a 25 °C, pH 7,1 (Wünsch et al., 1963, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Química. 333, 149-51).

El proceso de acuerdo con la presente invención se caracteriza típicamente por una actividad relativamente baja de la colagenasa durante la etapa de tratamiento enzimático (b). En este caso, la cantidad indicada de actividad de la colagenasa se indica para el punto temporal en el que se añade la colagenasa. Por ejemplo, en caso de que la colagenasa pierda actividad con el tiempo durante la etapa b), no se añade colagenasa adicional. Sin embargo, la colagenasa no suele ser autodigestiva y, por tanto, es relativamente estable, por lo que cabe suponer razonablemente que, una vez añadida, la colagenasa está presente durante toda la fase de tratamiento enzimático (b).

La actividad de la colagenasa puede indicarse adecuadamente con referencia al volumen total del Amortiguador de Digestión. En una realización, el Amortiguador de Digestión comprende una actividad específica de colagenasa de 0,01 Wunsch U/ml a 10 Wunsch U/ml, preferentemente de 0,05 Wunsch U/ml a 5 Wunsch U/ml, preferentemente de 0,1 Wunsch U/ml a 1 Wunsch U/ml, preferentemente de 0,15 Wunsch U/ml a 0,5 Wunsch U/ml, preferentemente, por ejemplo, ca. 0,1 Wunsch U/ml o ca. 0.2 Wunsch U/ml. En una realización, el límite inferior de la actividad de la colagenasa no está particularmente definido, a condición de que la actividad de la colagenasa añadida sea suficiente para liberar las células estromales mesenquimales del tejido en 5 horas o menos. En esta y otras realizaciones, el límite superior de la actividad colagenasa puede definirse como no más de 0,5 Wunsch U/ml, más preferentemente no más de 0,25 Wunsch U/ml, y específicamente 0,18 Wunsch U/ml o 0,09 Wunsch U/ml.

En una realización preferente, la colagenasa está presente durante la etapa de tratamiento enzimático (b) a una actividad específica de no más de 0,5 Wunsch U/ml, más preferentemente no más de 0,25 Wunsch U/ml, y específicamente 0,18 Wunsch U/ml con respecto al Amortiguador de Digestión. Aún más preferentemente, la actividad de la colagenasa utilizada en la etapa (b) del procedimiento de acuerdo con la presente invención está en el intervalo de 0,18 a 0,09 Wunsch U/ml de Amortiguador de Digestión (véase también el Ejemplo 1). Esta actividad difiere de la actividad de la colagenasa utilizada de acuerdo con el documento WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229. De hecho, en una realización, la actividad de colagenasa durante la etapa (b) del procedimiento de la presente invención puede definirse como inferior a la actividad de colagenasa descrita por los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al. (*supra*).

Alternativamente, la actividad de la colagenasa puede indicarse adecuadamente en relación con el peso del tejido a digerir. (El peso de dicho tejido puede determinarse convenientemente pesando el recipiente en el que está contenido antes y después de llenarlo con dicho tejido) Dicho tejido, opcionalmente incluido en un recipiente, comprende opcionalmente una solución salina amortiguada (por ejemplo, SSAH). En una realización, una proporción adecuada se encuentra en el intervalo de 0,01 a 10 Wunsch U colagenasa/100 mg de tejido, preferentemente de 0,05 a 5 Wunsch U colagenasa/100 mg de tejido, preferentemente de 0,1 a 1 Wunsch U colagenasa/100 mg de tejido, preferentemente de 0,15 a 0,5 Wunsch U colagenasa/100 mg de tejido, preferentemente, por ejemplo, ca. 0,1 Wunsch U colagenasa/100 mg de tejido o ca. 0.2 Wunsch U de colagenasa/100 mg de tejido. En una realización, el límite inferior de la actividad de la colagenasa no está particularmente definido, a condición de que la actividad de la colagenasa añadida sea suficiente para liberar las células estromales mesenquimales del tejido en 5 horas o menos. En esta y otras realizaciones, el límite superior de la actividad colagenasa puede definirse como no más de 0,5 Wunsch U colagenasa/100 mg tejido, más preferentemente no más de 0,25 Wunsch U colagenasa/100 mg tejido, y específicamente ca. 0,16 Wunsch U colagenasa/100 mg tejido o ca. 0.08 Wunsch U colagenasa/100 mg tejido, o cualquier valor dentro de ese intervalo preferente. Es preferente en la presente invención que la relación entre la actividad de la colagenasa y el peso total del tejido sea inferior a la actividad de la colagenasa descrita por los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229.

(3) Los inventores han descubierto además que la presencia de lisado de plaquetas durante la digestión enzimática es ventajosa. Se trata de un hallazgo sorprendente de los inventores. Ha habido cierto prejuicio en el arte de que la colagenasa no funcionaría bien en presencia de lisado de plaquetas. Por ejemplo, anteriormente se había descrito que la actividad colagenolítica era inhibida por el plasma humano normal, debido a inhibidores como la α_1 -antitripsina (Chesney et al., J. Clin. Invest., 1974, vol. 53, p. 1647-1654). Sin embargo, los inventores han descubierto que la digestión con colagenasa es eficaz incluso en presencia de lisado de plaquetas. De hecho, la digestión de la colagenasa es eficaz incluso con las cantidades muy bajas de colagenasa preferentes en la presente invención (véase más arriba). De este modo, preferentemente, el lisado de plaquetas está presente durante el tratamiento enzimático. El lisado plaquetario puede obtenerse de fuentes comerciales o prepararse fresco. Muchos hospitales, bancos de sangre e instituciones de investigación han establecido protocolos para preparar lisados de plaquetas, y tales lisados son generalmente adecuados en el contexto de la invención. Por ejemplo, puede obtenerse por medio de un proceso de congelación-descongelación. Estos lisados pueden obtenerse congelando una suspensión de plaquetas y descongelando a continuación el material, aunque también son adecuados otros regímenes de congelación-descongelación, a condición de que conduzcan a la citólisis de las plaquetas. Con la técnica de congelación-descongelación, este procedimiento provoca que las células se hinchen y se rompan, presumiblemente porque se forman cristales de hielo, seguidos de contracción al descongelarse. De este modo, la hinchazón y contracción cíclicas acaban provocando la rotura de las plaquetas. Pueden utilizarse preferentemente ciclos múltiples para una citólisis más completa, pero la citólisis "más completa" no es necesariamente necesaria. Pueden darse diversos grados de citólisis plaquetaria, por ejemplo, al menos un 30%, al menos un 50%, al menos un 70%, al menos un 90% o hasta un 100% de citólisis, de acuerdo con el recuento de plaquetas. Opcionalmente, el material no lisado y otros restos se eliminan del lisado de plaquetas antes de su uso.

Preferentemente, el lisado plaquetario comprende plaquetas de mamífero lisadas, y opcionalmente plasma de mamífero. En el segundo caso, el lisado plaquetario es una composición que comprende lisado plaquetario y plasma. Las razones por las que el plasma puede estar comprendido incluyen realizaciones en las que las plaquetas no han sido completamente separadas del plasma antes de su lisis y/o en las que las plaquetas han sido (re)suspendidas en plasma antes de su lisis. Preferentemente, la concentración de plasma de mamífero en la composición es inferior a aproximadamente el 30 %, inferior a aproximadamente el 20 % o inferior a aproximadamente el 10 % del volumen total. Preferentemente, la concentración de plasma de mamífero en el lisado plaquetario es de aproximadamente 0 % a aproximadamente 10 %, tal como de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %. Opcionalmente, el lisado plaquetario comprende plaquetas concentradas. Preferentemente, el lisado de plaquetas de mamífero es un lisado de plaquetas humanas. Preferentemente, el lisado plaquetario está sustancialmente libre de membranas plaquetarias de mamíferos.

El lisado plaquetario puede generarse a partir de plaquetas individuales o agrupadas donadas por un donante, aisladas de sangre total o por aféresis. Preferentemente, la aféresis se basa en la separación de sustancias que tienen densidades diferentes, como la centrifugación, y/o, la aféresis implica la absorción en perlas recubiertas con un material absorbente y la filtración.

Opcionalmente, el lisado de plaquetas utilizado en la presente invención se obtiene lisando una suspensión que contiene plaquetas, en la que las plaquetas están opcionalmente suspendidas en plasma. Dicha suspensión que contiene plaquetas comprende preferentemente entre 1×10^8 plaquetas/ml y 5×10^9 plaquetas/ml, preferentemente entre $3,8 \times 10^8$ plaquetas/ml y $1,2 \times 10^9$ plaquetas/ml, en promedio ca. 7.9×10^8 plaquetas/ml.

También se prevé que la presencia de lisado de plaquetas contribuya a suavizar la digestión enzimática. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que la presencia de lisado de plaquetas no tiene ningún efecto negativo en la digestión de las células (para ilustración, véanse los Ejemplos 2A y 3), aunque anteriormente se había informado de que el lisado de plaquetas afectaba negativamente a la actividad de ciertas enzimas, incluidas las proteasas. Por lo tanto, es una piedra angular importante del procedimiento de acuerdo con la presente invención que el tratamiento enzimático, más concretamente la digestión con colagenasa, pueda realizarse en presencia de lisado de plaquetas.

Preferentemente, el lisado de plaquetas está presente durante la digestión enzimática en un porcentaje de volumen del 0,01 % al 30 %, tal como del 0,05 % al 20 %, preferentemente del 0,1 % al 10 %, más preferentemente del 0,5 % al 5 %, más preferentemente del 0,8 % al 2 %, y lo más preferentemente alrededor del 1 %. "porcentaje de volumen" significa el volumen total de lisado de plaquetas presente en el volumen total del Amortiguador de Digestión.

Los inventores han constatado que la presencia de lisado de plaquetas o de sus derivados durante la digestión enzimática, en particular en la proporción indicada anteriormente, es ventajosa.

El término "lisado de plaquetas", cuando se menciona en la presente memoria descriptiva, comprende tanto el lisado de plaquetas obtenido directamente por lisis de plaquetas, como sus derivados, tal como el lisado de plaquetas inactivado por calor, el lisado de plaquetas filtrado estéril, etc. En algunos casos, el uso de derivados puede ser necesario o recomendable, por ejemplo, por motivos reglamentarios. En una realización más preferente, el lisado de plaquetas está esencialmente libre de agentes contaminantes. Un lisado de plaquetas esencialmente libre de agentes contaminantes se define en la presente memoria descriptiva como una preparación estéril de plaquetas esencialmente libre de agentes infecciosos tales como virus (encapsulados y no encapsulados), parásitos, bacterias y endotoxinas, es decir, un lisado de plaquetas que contiene tales agentes infecciosos en una cantidad que no puede detectarse con sistemas de identificación basados en cultivos, serológicos o moleculares o con la prueba de LAL (endotoxinas). Es preferente encarecidamente el lisado de plaquetas inactivado por patógenos (PI-LP), véase, por ejemplo, los documentos WO 2013/042095 A1 y Ludicone et al., 2014, J. Transl. Med., 12: 28.

Hay varias ventajas asociadas con la presencia de lisado de plaquetas durante el tratamiento enzimático, que no se esperaban, y que se describirán a continuación.

En primer lugar, los inventores descubrieron que la presencia de lisado de plaquetas humanas no bloquea la actividad enzimática de la enzima colagenasa, al menos no hasta un punto que interfiera negativamente con la liberación enzimática deseada de las células de la matriz estromal.

En segundo lugar, los inventores descubrieron que las células obtenibles por digestión en presencia de lisado de plaquetas o derivados se caracterizan por una excelente viabilidad (véase, por ejemplo, la Fig. 4A).

En tercer lugar, los inventores descubrieron que las células obtenibles por digestión en presencia de lisado de plaquetas o derivados en el procedimiento de acuerdo con la presente invención tienen excelentes propiedades proliferativas. De este modo, preferentemente, en la etapa (b) la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma se somete a tratamiento enzimático en presencia de lisado de plaquetas de mamífero (LP) o derivados de las mismas, más preferentemente lisado de plaquetas humanas (LPh) o derivados de las mismas.

Si bien las plaquetas contienen moléculas bioactivas y factores de crecimiento como factores de coagulación, moléculas de adhesión y proteoglicanos, factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (FCBDF), factor de

crecimiento epidérmico (FCE), HGF, factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1), TGF- β 1 y otros, también se sabe que contienen inhibidores de la proteasa (Astori et al., Stem Cell. Res. Ther., 2016, vol. 7, 93). En vista de esta enseñanza, es notable el hallazgo de que el lisado de plaquetas puede estar convenientemente presente durante el tratamiento enzimático.

5 En general, las condiciones específicas de extracción, que divergen de los protocolos de digestión con colagenasa de acuerdo con el estado de la técnica, pudieron demostrarse beneficiosas para la viabilidad celular y la extracción celular y, por tanto, proporcionan un proceso de aislamiento sorprendentemente ventajoso. En particular, es posible obtener un mayor rendimiento celular durante el proceso de aislamiento de acuerdo con la presente invención que por medio del proceso descrito por Seshareddy et al. (2008, Meth. Cell Biol., vol. 86, p. 101-119). Más concretamente, De acuerdo con la presente invención, es posible obtener un rendimiento celular durante el proceso de aislamiento que es 10-25 veces superior al rendimiento celular descrito por Seshareddy et al. (*supra*). Debido a la excelente viabilidad de las células aisladas de acuerdo con la presente invención, las células pueden expandirse eficazmente *in vitro*, si se desea.

15 Preferentemente, sólo se realiza una etapa de digestión con colagenasa en el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Esto significa que el tejido procedente del cordón umbilical, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, se somete a tratamiento con colagenasa durante un intervalo de tiempo determinado, y tras la finalización de dicho intervalo de tiempo, se recuperan las células que se han aislado físicamente o desprendido del tejido, sin embargo, el tejido restante no se somete a una o más rondas adicionales de digestión con colagenasa. Más bien, se descarta preferentemente tras la finalización del intervalo de tiempo y la recuperación de las células.

20 Al final del intervalo de digestión, la mezcla de digestión puede diluirse con una solución que contenga proteínas, como un medio basal suplementado con lisado de plaquetas. El momento de la adición de la solución que contiene proteínas define el final del tiempo de digestión. El tipo de medio basal no está particularmente limitado, a condición de que el medio sea adecuado para el cultivo de células de mamífero, preferentemente, sin embargo, células madre mesenquimales y/o células estromales mesenquimales. La solución que contiene proteínas comprende preferentemente heparina.

25 Un medio basal preferente es MBQDCM (medio basal químicamente definido para células mesenquimales, Lonza), y un suplemento preferente es 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas (LPh).

30 Se cree que la adición de una solución que contenga proteínas, tal como el lisado de plaquetas humanas, inhibe la actividad enzimática. Sin querer ceñirnos a tal teoría, la adición también produce una dilución de la enzima. Preferentemente, se añade al menos 1 volumen de la solución que contiene proteínas, con respecto al volumen de la mezcla de digestión. La solución que contiene proteínas debe ser, por supuesto, una solución que no sea incompatible con fines de cultivo celular, es decir, ilustrativamente debe ser estéril, y opcionalmente de grado BPF, etc.

35 Preferentemente, el líquido que comprende el tejido que ha sido sometido a digestión (líquido post-digestión) se somete posteriormente a separación. El término "separación", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva con referencia a dicho líquido post-digestión, no está particularmente limitado y, en general, significa que las células pueden separarse del tejido no digerido, del tejido digerido incompletamente y de otros restos por medio de un procedimiento adecuado, incluyendo la filtración y la centrifugación. En una realización, dicho líquido postdigestión se filtra, para separar las células liberadas del tejido no digerido, del tejido digerido de forma incompleta y de otros restos, por ejemplo, por medio de filtración, por ejemplo, filtración a través de una malla de 120 μ m o filtración a través de gasa, como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, Del Bue et al., 2007, Veterin. Res. Comm, vol. 31, p. 289-292).
40 Por ejemplo, es adecuado un tamaño de poro de filtro (malla) de 50 a 150 μ m, tal como de 70 a 100 μ m. Opcionalmente, el material filtrante es una gasa; pueden utilizarse múltiples capas de gasa. De este modo, preferentemente, el líquido que contiene el tejido sometido a digestión se filtra a través de una gasa. El filtrado se denomina entonces "mezcla digerida". Otro procedimiento adecuado para la separación incluye la centrifugación a baja velocidad; en ese caso, las células permanecen en el sobrenadante, mientras que el tejido no digerido, el tejido digerido de forma incompleta y otros restos se granulan; en ese caso, el sobrenadante se denomina "mezcla digerida". Opcionalmente, se pueden combinar la filtración y la centrifugación a baja velocidad, en cualquier orden. Alternativamente, la separación se realiza sólo por filtración o sólo por centrifugación a baja velocidad, siendo preferente sólo la filtración.

50 Preferentemente, la mezcla digerida se centrifuga a continuación, preferentemente después de la filtración. La persona experta puede ajustar las condiciones de centrifugación a las adecuadas para granular las células estromales mesenquimales, sin dañar sus propiedades proliferativas ni su viabilidad. Por ejemplo, la mezcla digerida puede centrifugarse a 680 \times g durante 15 minutos mediante el uso de tubos de centrifuga de 250 ml. Al final de la centrifugación, se elimina el sobrenadante y se vuelve a suspender el precipitado, que contiene las células deseadas. Idealmente, en las realizaciones en las que el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una o más etapas de expansión, el sedimento celular se vuelve a suspender en el mismo medio de crecimiento que se utilizó en la (primera) etapa de expansión. La expansión de acuerdo con la presente invención se describirá posteriormente en detalle.

55 Normalmente, la mezcla digerida comprende múltiples células, es decir, una población celular. Preferentemente, la población celular obtenida por medio del tratamiento enzimático descrito en la presente memoria descriptiva se utiliza

directamente tal como se ha obtenido, es decir, sin ninguna selección negativa (destrucción selectiva de células no deseadas). Un uso adecuado pero opcional consiste en la expansión de las células, que se describirá a continuación.

5 Un ejemplo ilustrativo del procedimiento de aislamiento se describe en el Ejemplo 2A. Como se muestra en el Ejemplo 3, el uso de lisado de plaquetas no influye negativamente en la actividad de la colagenasa, en la liberación de células y en su viabilidad. Se trata de un hallazgo sorprendente, ya que anteriormente se había informado de que el lisado de plaquetas afectaba negativamente a la actividad de determinadas enzimas, incluidas las proteasas.

El tratamiento enzimático se realiza preferentemente en condiciones estériles.

10 El aislamiento de una célula individual, si se desea, puede lograrse, por ejemplo, por medio de dilución en serie. De este modo, se obtiene una célula individual aislada. La dilución en serie es una etapa opcional que sigue a la etapa (b); sin embargo, la obtención de una única célula aislada no es un objeto principal de la invención; más bien, es preferente que a la etapa (b) le siga la etapa (c) para la expansión de la(s) célula(s), como se describe a continuación.

Expansión

15 Las células obtenidas durante el aislamiento, en particular las etapas (a) y (b) del procedimiento de la invención, pueden expandirse (es decir, someterse a expansión). Las células se expanden *ex vivo*. La expansión *ex vivo* permite al experto seleccionar condiciones definidas para el cultivo. Se describen a continuación.

La expansión tiene por objeto multiplicar las células previamente aisladas, que tienen propiedades ventajosas. Como es habitual en la técnica, la expansión se produce en un medio de cultivo. A menos que se especifique lo contrario, las condiciones adecuadas para la expansión incluyen condiciones generalmente conocidas por ser adecuadas para el cultivo de células de mamífero, más específicamente para la expansión de células de mamífero.

20 La expansión es un periodo del proceso de cultivo/producción celular que se caracteriza predominantemente por un alto crecimiento celular y una elevada actividad mitótica. En la presente invención, la expansión sirve, *entre otras cosas*, para aumentar el número de células, lo que significa generar un mayor número de células, preferentemente mitóticamente activas y más preferentemente en fase de crecimiento exponencial. Por medio de la expansión, se pueden obtener poblaciones celulares más grandes. La etapa de expandir las células de acuerdo con la presente
25 invención puede ser una única etapa de permitir que las células proliferen en condiciones apropiadas: Sin embargo, más preferentemente, la expansión de acuerdo con la presente invención comprende múltiples pasajes, como se describirá más adelante.

La expansión se lleva a cabo generalmente en condiciones estériles, y típicamente también en condiciones por lo demás necesarias o útiles o recomendadas para el cultivo de células de mamífero.

30 Esta realización de la invención se basa en el descubrimiento de que una sección específica de la Jalea de Wharton, es decir, la Jalea de Wharton estromal, comprende células que pueden aislarse de forma eficiente y fiable, y posteriormente expandirse de forma eficiente y fiable. De este modo, una vez aisladas las células, su población se expande mitóticamente.

35 De este modo, opcionalmente y muy generalmente, el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende una o más etapas adicionales. En particular, en realizaciones preferentes de la presente invención, una etapa para aumentar el número de células comprendidas, aprovechando el potencial de división celular de las células obtenidas en la etapa (b). En tales realizaciones preferentes, la etapa (b) va seguida de una etapa (c); la etapa (c) comprende la expansión de la al menos una célula obtenida en la etapa (b). La etapa (c) también se denomina en la presente memoria descriptiva "etapa de expansión" o simplemente "expansión".

40 Las condiciones para la expansión se seleccionan para que sean adecuadas para el crecimiento *ex vivo* y la división celular de las células estromales mesenquimales. De este modo, se obtiene un cultivo enriquecido en células estromales mesenquimales. Sin querer ceñirse a una teoría concreta, es posible prever que, o bien el cultivo selecciona un subconjunto específico de las células aisladas, enriqueciéndolas de este modo, o bien las células están cambiando su fenotipo.

45 La expansión de acuerdo con la presente invención proporciona sinergias con el aislamiento de acuerdo con la invención, como sigue: aunque el número total de células aisladas en las condiciones suaves preferentes de acuerdo con la presente invención puede ser (y típicamente es) inferior al número total de células extraíbles por el procedimiento sugerido por los documentos US 2004 0136967 A1 y Seshareddy et al., Meth. Cell Biol., 86:101-119, 2008, los inventores han encontrado que las células de las células aisladas en las condiciones suaves preferentes de
50 acuerdo con la presente invención son particularmente adecuadas para la expansión, por ejemplo, en vista de su alto porcentaje de viabilidad (para ilustración véase la Fig. 4B), y también en vista de su alto potencial proliferativo (para ilustración véase la Fig. 9), y, por lo tanto, se puede obtener un alto número de células expandiendo las células derivadas de JWE aisladas de acuerdo con la presente invención. En otras palabras, el procedimiento de aislamiento preferente de acuerdo con la presente invención junto con la expansión de acuerdo con la presente invención tienen
55 la ventaja sinérgica de que se requiere menos material de partida y/o menos pasajes para llegar a un número celular

específico deseado porque la mayoría de las células que se someten a la expansión son viables, y proliferan particularmente bien.

5 Preferentemente, las células derivadas del cordón umbilical obtenidas de acuerdo con la presente divulgación son las únicas células sometidas a la etapa de expansión. En tales realizaciones, es particularmente preferente que no haya células alimentadoras presentes durante la etapa de expansión.

10 La expansión ocurre típicamente en un recipiente de cultivo. Más concretamente, las células destinadas a ser sometidas a expansión se siembran en un recipiente de cultivo. Los recipientes de cultivo típicos son los matraces, las placas y las pilas (en las que las pilas se componen normalmente de una multitud de placas apiladas unas sobre otras). Los recipientes de cultivo particularmente adecuados en el contexto de las presentes invenciones son los recipientes de cultivo que permiten la adherencia de células en el fondo del recipiente de cultivo; tales recipientes son matraces, placas y pilas con una superficie de fondo plana. Preferentemente, el recipiente de cultivo tiene al menos una superficie de suelo de plástico. Más preferentemente, el recipiente de cultivo es un recipiente de cultivo de plástico. Preferentemente, el recipiente de cultivo tiene una superficie plana ("fondo plano").

15 El tipo de plástico no está particularmente limitado, a condición de que sea adecuado para el cultivo de células; sin embargo, son preferentes los polímeros hidrófobos, como el poliestireno en particular, opcionalmente modificado en superficie. La modificación de la superficie puede lograrse por medio de la técnica del plasma, que permite disponer de una variedad de grupos químicos funcionales en la superficie del poliestireno, y que son adecuados para la adherencia de células en general. Estas técnicas forman parte del estado actual de la técnica, y existen en el mercado recipientes de plástico de superficie modificada para el cultivo de células adherentes.

20 Preferentemente, sin embargo, la superficie del recipiente de cultivo celular no está revestida de proteína antes de su uso. En particular, no está revestido de proteínas como las de la matriz celular, como el colágeno y la polilisina.

Preferentemente, la expansión se realiza para múltiples pasajes. Los detalles de los pasajes se describen a continuación.

Medio de crecimiento

25 El medio de crecimiento para la expansión de acuerdo con la presente invención comprenderá típicamente un medio basal y uno o más suplementos. En sentido amplio, el tipo de medio basal utilizado no está especialmente limitado. Los medios basales típicos están en base acuosa y químicamente definidos. "químicamente definido" significa que el medio basal está compuesto de ingredientes específicos en cantidades específicas; la ventaja de los medios basales químicamente definidos es que pueden prepararse de forma reproducible, sin variaciones debidas a las condiciones experimentales, de laboratorio, etc. El medio basal suele ser estéril. Los medios basales para el crecimiento de células de mamíferos están disponibles en el mercado a través de diferentes proveedores comerciales.

30 Típicamente, los medios basales comprenden ingredientes que comprenden aminoácidos, sales (tales como cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y fosfato monosódico), glucosa y vitaminas (tales como ácido fólico, nicotinamida, riboflavina, B₁₂), al menos un agente amortiguador (como por ejemplo HEPES) y típicamente también un agente colorante (por ejemplo rojo fenol); sin embargo, esto no es esencial. La mayoría de los medios basales disponibles en el mercado incluyen rojo de fenol como indicador de pH (agente colorante), lo que permite controlar constantemente el pH.

Preferentemente, el medio de crecimiento basal es uno que no requiere la adición de una matriz de fijación a las células de la placa.

40 [Preferentemente, el medio basal no contiene suero. Libre de suero significa que no contiene suero humano ni animal. Más preferentemente, el medio basal es un medio basal químicamente definido, exento de suero

45 Preferentemente, el medio basal está químicamente definido. Un medio basal químicamente definido es un medio basal adecuado para el cultivo celular *in vitro* de células humanas o animales en el que todos los componentes químicos son conocidos. En particular, los medios químicamente definidos requieren que todos los componentes estén identificados y se conozcan sus concentraciones exactas. Por lo tanto, un medio químicamente definido debe estar totalmente exento de componentes de origen animal y no puede contener suero ni proteínas derivadas del suero, como suero fetal bovino, seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana. Un medio basal químicamente definido no comprende únicamente proteínas y/u hormonas recombinantes. Para ello, los medios químicamente definidos no comprenden componentes de origen humano o animal, tales como proteínas y/o factores de crecimiento; en particular, no comprenden albúmina de origen humano o animal, ni factores de crecimiento de origen humano o animal.

50 Preferentemente comprende albúmina recombinante y/o factores de crecimiento recombinantes, normalmente derivados de fuentes no humanas, no animales, tales como células vegetales y bacterias, y/o sustancias químicas sintéticas como, por ejemplo, alcohol polivinílico.

En algunas realizaciones, un medio basal químicamente definido comprende

(a) un medio basal convencional (tal como MEMD, F12 o RPMI 1640, que contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, amortiguadores, antioxidantes y fuentes de energía), y

5 b) uno o más ingredientes sustituyentes del suero, opcionalmente seleccionados de entre los que figuran en la siguiente lista abierta: albúmina recombinante, lípido(s) químicamente definido(s), insulina recombinante y/o ion(es) metálico(s) tal como el zinc, la transferrina recombinante o el hierro, el selenio y un tiol antioxidante como el 2-mercaptoetanol o el 1-tioglicerol.

10 Los medios basales pueden, por ejemplo, seleccionarse de la lista que comprende, entre otros, el medio esencial mínimo de Eagle (MEME), el medio de Eagle modificado de Dulbecco (MEMD), alpha-MEM, RPMI-1640, IMDM y otros. Si se desea, se añaden a estos medios uno o más ingredientes sustitutivos del suero. De este modo, se obtienen medios basales libres de suero.

15 Más preferentemente, el medio basal es un medio basal adecuado para el cultivo de células estromales mesenquimales y/o células madre mesenquimales. Preferentemente, el medio de crecimiento basal es adecuado para múltiples pasajes de expansión de CEMs, particularmente de CEMs humanas, más particularmente de CEMs estromales derivadas de Jalea de Wharton (preferentemente humanas).

20 Los medios adecuados para el cultivo de células estromales mesenquimales y/o células madre mesenquimales están disponibles comercialmente y algunos de ellos se comercializan específicamente para tal fin. Por ejemplo, TheraPEAK™ MBQDCM (a lo largo de este documento denominado MBQDCM, para simplificar) es un medio basal químicamente definido que ha sido descrito como adecuado para células madre mesenquimales por su fabricante Lonza (Wakersville, MD, USA; Cat. Núm. 95062-688). De hecho, los presentes inventores han identificado este medio basal como particularmente adecuado. Por lo tanto, MBQDCM es un medio basal preferente para su uso en la presente invención.

25 Igualmente preferentes son todos los medios basales sustancialmente equivalentes a MBQDCM. El término "sustancialmente equivalente" se define a continuación. La similitud de la composición del medio basal, en términos de ingredientes y sus cantidades relativas, puede comprobarse por medio de una combinación de procedimientos cromatográficos y/o espectrométricos, o similares.

30 En general, encontrar un medio de cultivo adecuado es muy importante para el rendimiento global de un cultivo celular. Esto se ha abordado identificando el MBQDCM y los medios basales sustancialmente equivalentes al mismo como un medio basal particularmente adecuado para la presente invención. MBQDCM es un medio basal químicamente definido para células mesenquimales y está disponible comercialmente en Lonza (Lonza, Wakersville, MD, EE.UU.), Cat. Núm. 95062-688. Las variaciones de MBQDCM, tales como los medios basales en particular que se componen o comprenden los mismos constituyentes que MBQDCM, aunque por ejemplo en otras cantidades o proporciones, o los medios basales que se componen o comprenden constituyentes parcial o totalmente diversos de los constituyentes de MBQDCM, aunque con un efecto sustancialmente equivalente sobre el crecimiento de CEMs, cuando se usan como se describe en la presente memoria descriptiva, están igualmente comprendidos por el uso de acuerdo con la presente invención.

35 Otros medios basales también son adecuados para la expansión de CEMs en el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, los inventores han descubierto que MEMD es un medio basal que también puede utilizarse, cuando está comprendido en un medio de crecimiento que comprende adicionalmente al menos un suplemento(s), como se describe a continuación (datos no mostrados).

40 En realizaciones importantes de la presente invención, el medio de crecimiento comprende un medio basal y al menos un suplemento(s), particularmente lisado de plaquetas. De este modo, preferentemente, la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que se basa en un medio basal y que contiene al menos un suplemento. El lisado plaquetario es un suplemento preferente.

45 "basado en" significa que el medio basal, por ejemplo MBQDCM, está suplementado con al menos un suplemento. Si los suplementos se añaden en forma líquida, entonces el medio basal se diluye ligeramente por la adición de al menos un suplemento; sin embargo, una ligera dilución no causa ninguna preocupación general. En una realización preferente, los suplementos pueden seleccionarse de la lista que comprende suero humano o animal, lisado plaquetario humano o animal, lisado celular humano o animal o vegetal, uno o más antibióticos, heparina, factores de crecimiento suplementarios tales como insulina o hidrocortisona, aminoácidos como glutamina u oligómeros de los mismos.

50 Preferentemente, el medio de crecimiento comprende heparina como suplemento. Las concentraciones adecuadas de heparina en el medio de crecimiento son de 0,1 a 100 U/mL, como por ejemplo de 1 a 10 U/mL, por ejemplo 2 U/mL. U representa una unidad (unidad Howell) de heparina, como se ha descrito anteriormente. Se puede añadir heparina al medio basal.

55 En una realización particularmente preferente, la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento basado en el medio basal MBQDCM (Lonza, Wakersville, MD, USA; Cat. Núm. 95062-688), o en un medio basal

sustancialmente equivalente. En la presente invención, la MBQDCM, por ejemplo, ha demostrado ser particularmente ventajosa para generar altas duplicaciones acumulativas de población/altos números de células.

Si dos medios basales son o no sustancialmente equivalentes entre sí, a efectos de la presente invención, se comprueba cultivando células, idealmente aisladas del mismo cordón umbilical, en medios de crecimiento basados en dichos medios basales en condiciones sustancialmente idénticas, es decir, con los mismos aditivos (por ejemplo, lisado de plaquetas), en las mismas cantidades, en las mismas placas de cultivo a la misma temperatura, etc., idealmente en paralelo. En otras palabras, para comprobar si dichos dos medios basales son sustancialmente equivalentes entre sí, la única variable en el ensayo de crecimiento es el propio medio basal. Las células son preferentemente CEM estromales derivadas de la Jalea de Wharton, aisladas como en el Ejemplo 1 y 2A, y subcultivadas ("P0") como en el Ejemplo 2B. Las células de P0, después de la tripsinización, se someten entonces a crecimiento, en paralelo, en un medio de crecimiento basado en un primer medio basal (por ejemplo, MBQDCM), y en un medio de crecimiento basado en un segundo medio basal (que se someterá a prueba para comprobar la equivalencia sustancial). Se considera que los dos medios basales son sustancialmente equivalentes cuando se observan las dos cosas siguientes: la duplicación acumulativa media de la población por chapado (P1-P8) es sustancialmente la misma (máximo 10 % +/- desviación) y la senescencia de las células obtenidas tras la etapa 8 (para referencia véase el Ejemplo 11) es sustancialmente la misma (máximo 10 % +/- desviación).

En una realización alternativa, el medio de crecimiento se basa en un medio basal que, aunque no es sustancialmente equivalente al MBQDCM, se caracteriza por lo siguiente: la duplicación acumulativa media de la población por chapado (P1-P8) es al menos un 70 % más alta, en comparación con el crecimiento en un medio de crecimiento por lo demás idéntico basado en el medio basal MBQDCM, y la senescencia de las células obtenidas después de la etapa 8 (para referencia véase el Ejemplo 11) es un 150 % o menos, en comparación con la senescencia de las células cultivadas en paralelo en un medio de crecimiento por lo demás idéntico, pero basado en el medio basal MBQDCM. MEMD (disponible comercialmente en diferentes proveedores) puede ser una encarnación de dicho medio basal.

Preferentemente, el medio de crecimiento favorece la diferenciación multilineal de las CEMs, en particular de las CEMs descritas en la presente memoria descriptiva. Si es necesario, se añaden suplementos a un medio basal para impulsar la diferenciación de las células hacia un linaje concreto. A continuación se describen las pruebas de diferenciación multilineal.

Preferentemente, el lisado de plaquetas o un derivado del mismo está presente en el medio de crecimiento. De este modo, un medio de crecimiento útil en la presente invención comprende preferentemente lisado de plaquetas. Más concretamente, los presentes inventores han demostrado que la combinación del medio basal MBQDCM, o medios basales sustancialmente equivalentes a éste, con el suplemento lisado de plaquetas es particularmente adecuada, y dicho medio de crecimiento es muy preferente. Preferentemente, cuando hay lisado de plaquetas, no hay suero humano o animal en el medio de crecimiento, y más preferentemente no hay lisado de células humanas, animales o vegetales distinto del lisado de plaquetas. El uso de lisado de plaquetas en el medio de crecimiento de acuerdo con la presente invención, en lugar de sueros humanos o animales, aborda las preocupaciones asociadas con el uso tradicional de sueros animales en vista de los riesgos de transmitir priones, virus o inducir reacciones inmunológicas en los receptores después de la infusión y las limitaciones reglamentarias en virtud de las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Si el lisado de plaquetas está presente en el medio de crecimiento, o más precisamente ha sido añadido a un medio basal (tal como MBQDCM de Lonza, por ejemplo, o un medio basal sustancialmente equivalente al mismo), entonces el lisado de plaquetas también puede ser referido como un suplemento al medio basal.

El lisado de plaquetas adecuado como suplemento en esta realización corresponde generalmente al lisado de plaquetas descrito para la realización de añadir lisado de plaquetas durante la digestión enzimática, descrita, anteriormente, sin embargo, las siguientes cuatro realizaciones adicionales más preferentes son idealmente cumplidas adicionalmente, solas o en combinación: En una primera realización particularmente preferente, el lisado de plaquetas procede de la misma especie (aunque típicamente no del mismo individuo) que el cordón umbilical. La ventaja asociada con el cultivo en presencia de lisado de plaquetas de la misma especie es sorprendente, sobre todo en vista de los prejuicios en el arte previo contra el uso de lisado de plaquetas de la misma especie para el cultivo de células estromales: por ejemplo, se había informado de que el lisado de plaquetas equinas no es generalmente ventajoso para el cultivo de células estromales mesenquimales equinas (Russell et al., 2016, Equine Vet. J., vol. 48, p. 261-264) y que el lisado de plaquetas caninas es inferior al suero bovino fetal para el aislamiento y la propagación de células estromales mesenquimales caninas (Russell et al., PLOS One, 2015, vol. 10, e0136621). Es fuertemente preferente que el lisado de plaquetas utilizado comprenda plaquetas de múltiples donantes, incluidas en cada preparación para compensar la variabilidad individual y obtener un producto de lisado de plaquetas más estandarizado y reproducible; la puesta en común de plaquetas obtenidas por abrigos leucocitarios derivados de sangre total es un procedimiento estandarizado, véase, por ejemplo, Ludicone et al., 2014, J. Transl. Med., 12: 28. Preferentemente, el lisado de plaquetas procede de sangre de mamífero. Dependiendo de la finalidad, se puede elegir un mamífero adecuado como fuente de sangre. Los mamíferos que se pretenden utilizar de acuerdo con la presente invención pueden ser en principio todos los animales, jóvenes o adultos, de los que se pueda recoger razonablemente la cantidad necesaria de plaquetas. En algunas realizaciones, se utilizan principalmente animales mamíferos adultos. Ejemplos de animales no humanos son los animales de abasto y otros animales de granja tales como bovinos, cerdos, ovejas o

aves de corral. Es preferente el lisado de plaquetas de mamíferos, y especialmente el lisado de plaquetas humanas (abreviado "LPh"). En algunas realizaciones, el mamífero es humano. En general, el lisado plaquetario añadido procede preferentemente de la misma especie que el cordón umbilical/células. En particular, para el cultivo de células procedentes del cordón umbilical humano, es preferente la adición de lisado de plaquetas humanas. El lisado de plaquetas suele ser alogénico a las células. En algunos casos, los donantes de sangre están sanos y cumplen los requisitos establecidos por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, la sangre puede cumplir los requisitos que una autoridad nacional de administración de alimentos o medicamentos impone a los productos destinados a la alimentación o al uso médico, o cumplir la normativa correspondiente en la zona geográfica en la que se ponga en práctica la presente invención. El lisado de plaquetas humanas puede sustituir, total o parcialmente (preferentemente totalmente), al suero fetal bovino. En la mayoría de las realizaciones preferentes, el lisado de plaquetas procede de donantes humanos. En estas realizaciones, es preferente que los donantes tengan menos de 50 años, 45 años, 40 años o menos.

En una segunda realización particularmente preferente, el lisado de plaquetas tiene una mayor actividad promotora del crecimiento sobre las células, particularmente sobre las CEM derivadas de la Jalea de Wharton como se describe en la presente memoria descriptiva, cuando se utiliza como suplemento en un medio de cultivo celular, en comparación con el suero bovino, particularmente el suero bovino fetal (SFB) a la misma concentración. En algunas realizaciones, la composición tiene al menos un 20 % más de actividad promotora del crecimiento en las células en comparación con el suero bovino fetal (SFB) a la misma concentración.

En una tercera realización particularmente preferente, la concentración de lisado de plaquetas en el medio de crecimiento es de aproximadamente 0,1 % (vol./vol.) a aproximadamente 20 % (vol./vol.), preferentemente de aproximadamente 0,5 % (vol./vol.) a aproximadamente 10 % (vol./vol.), más preferentemente de aproximadamente 1 % (vol./vol.) a aproximadamente 5 % (vol./vol.), tal como 1 % (vol./vol.) a aproximadamente 10 % (vol./vol.) a aproximadamente 10 % (vol./vol.), más preferentemente de aproximadamente 1 % (vol./vol.) a aproximadamente 5 % (vol./vol.), tal como 1 % (vol./vol.), 2 % (vol./vol.), 3 % (vol./vol.), 4 % (vol./vol.) o 5 % (vol./vol.). Alrededor del 5 % (vol./vol.) ha demostrado ser particularmente útil (véanse ejemplos en la presente memoria descriptiva) y por ello es preferente, en particular en combinación con un medio basal químicamente definido adecuado para células madre mesenquimales, como MBQDCM (Lonza), o un medio basal sustancialmente equivalente al mismo.

En una cuarta realización particularmente preferente, el lisado de plaquetas que se añade al medio de crecimiento comprende derivados de plaquetas. Alternativamente, el lisado de plaquetas está sustancialmente libre de membranas de plaquetas de mamíferos y/u otros restos celulares. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, sustancialmente libre significa que sólo hay una cantidad no detectable de membranas plaquetarias, o que la cantidad de membranas plaquetarias no puede reducirse más por ningún procedimiento razonable y comercialmente sólido, o que la cantidad de membranas plaquetarias no interfiere sustancialmente con el uso del lisado plaquetario. Las membranas plaquetarias pueden separarse del lisado plaquetario mediante el uso de cualquier procedimiento adecuado conocido en la materia, como el gradiente de densidad.

Algunas realizaciones útiles se proporcionan en los Ejemplos 0 y 2.

Preferentemente, el lisado plaquetario o sus derivados están presentes preferentemente durante toda o parte de la etapa de expansión (c). De este modo, preferentemente, en la etapa (c) la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que comprende lisado de plaquetas (LP) o derivados del mismo, preferentemente lisado de plaquetas humanas (LPh) o derivados del mismo.

Sin querer atarse a ninguna teoría, se prevé que la presencia de lisado de plaquetas proporciona nutrientes y factores de crecimiento y contribuye a un entorno que permite la expansión eficiente de las células. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría, también es concebible que la presencia de lisado de plaquetas ayude a equilibrar o inhibir cualquier actividad enzimática restante tras la extracción enzimática, y por tanto a la suavidad de las condiciones durante la fase de expansión posterior. El lisado de plaquetas humanas (LPh) es preferente para su uso con CEM humanas.

De este modo, en la presente invención, el lisado de plaquetas (LP) puede ser una alternativa al suero animal para cultivar células estromales mesenquimales (para ilustración y más detalles véase también el documento WO 2013/042095 A1). Se sabe que las plaquetas son una rica fuente de numerosos factores de crecimiento, como el FCDP (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), el b-FGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), el FCEV (factor de crecimiento endotelial vascular) y el TGF- β (factor de crecimiento transformante- β).

Opcionalmente, uno o más antibióticos están presentes en el medio de crecimiento. Si es de este modo, el uno o más antibióticos pueden añadirse al medio basal como suplementos. Los antibióticos adecuados en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, la anfotericina y la gentamicina, entre otros. Las concentraciones de uno o más antibióticos en el medio de crecimiento se sitúan preferentemente en los intervalos de concentración normalmente utilizados en la técnica. Alternativamente, no se añade ningún antibiótico al medio de crecimiento.

Preferentemente, no se añade al medio basal ningún ingrediente adicional aparte de los enumerados anteriormente. En particular, es muy preferente que la al menos una célula se expanda en un medio de crecimiento que no comprenda ningún suero añadido, en particular ningún suero bovino, como el suero fetal bovino (SFB). En otras palabras, aunque

el lisado de plaquetas añadido al medio de cultivo contenga algo de suero o trazas de suero, puede decirse que el medio de cultivo no contiene "suero añadido", con lo que se pretende especificar que el suero no se añade como ingrediente de cultivo celular en el sentido clásico. En la presente invención, el SFB es un aditivo indeseable, por ejemplo, porque conlleva el riesgo de transmitir enfermedades víricas y priónicas. En cambio, el procedimiento de la presente invención funciona eficazmente en presencia de lisado de plaquetas, por ejemplo como sustituto del SFB. Para el crecimiento de CEM humanas, es preferente el lisado de plaquetas humanas como aditivo frente al SFB.

Preferentemente, no se proporciona ni está presente ninguna matriz de fijación cuando las células se someten a un pasaje en una placa de crecimiento. Por lo tanto, no se proporciona ni está presente ninguna matriz de fijación cuando se siembran las células y/o no se añade ninguna matriz de fijación como suplemento al medio basal.

10 **Pasajes**

En una realización preferente, las células se expanden en uno o más pasajes.

"Pasaje" se relaciona con un cultivo de células en un recipiente de cultivo (de un tipo determinado), dentro del cual se siembran las células para iniciar el respectivo pasaje. Normalmente las células se adhieren a dicho recipiente de cultivo mientras se cultivan, y las células normalmente se expanden dentro de dicho recipiente de cultivo mientras se cultivan. El final de un pasaje se define por el desprendimiento de las células normalmente adherentes (por ejemplo, por medio de tripsinización). A continuación, las células se siembran opcionalmente en un nuevo recipiente de cultivo del mismo tipo o de otro diferente; la siembra en el nuevo recipiente de cultivo define el inicio de un pasaje posterior. De este modo, cuando las células, tras dicha expansión, se transfieren de ese recipiente de cultivo a otro recipiente de cultivo, entonces las células presentes en ese otro recipiente de cultivo representan el siguiente pasaje.

"Cosecha" se relaciona con el proceso de obtener sustancialmente todas las células crecidas en un recipiente de cultivo al final de un pasaje.

Para cada pasaje, se puede utilizar un recipiente de cultivo; sin embargo, es más preferente utilizar múltiples recipientes de cultivo en paralelo para cada pasaje. A continuación, las células se cultivan en paralelo en los múltiples recipientes de cultivo, en condiciones sustancialmente idénticas durante sustancialmente el mismo tiempo. Preferentemente, la densidad de siembra en los múltiples recipientes de cultivo es sustancialmente la misma.

Al principio de cada pasaje, se añaden células (no adherentes/aisladas, preferentemente en un número/densidad deseados) a un recipiente de cultivo que contiene medio de crecimiento.

Aunque no son necesarios para el crecimiento celular, los antibióticos se utilizan a menudo para controlar el crecimiento de contaminantes bacterianos y fúngicos. Esto es particularmente preferente en los primeros pasajes, pero no es preferente en pasajes posteriores, como por ejemplo de P2 en adelante o de P1 en adelante. Por lo tanto, incluso si los antibióticos están presentes en el primer pasaje después del aislamiento de las células ("P0"), los antibióticos se suspenden preferentemente para todos los pasajes después de P0; en otras palabras, un medio de crecimiento sin adición de antibióticos puede ser utilizado para P1 y todos los pasajes posteriores. De este modo, en la presente invención, los antibióticos están presentes preferentemente como suplemento en el primer cultivo celular (por ejemplo, P0) tras el aislamiento de las células del cordón umbilical, pero no en los cultivos celulares posteriores, es decir, en los subcultivos de P0.

Al final de cada pasaje, cuando las células han alcanzado un porcentaje de confluencia de acuerdo con el criterio 3 de la tabla siguiente, se cosechan las células. Para ese propósito, se aspira el medio de crecimiento (y las células no adherentes que contenga, si las hubiera), las células adherentes se lavan opcionalmente con un amortiguador estéril adecuado y, opcionalmente pero preferentemente, se separan enzimáticamente, tal como siendo tripsinizadas, se cuentan opcionalmente, se concentran opcionalmente pero preferentemente por medio de centrifugación y se vuelven a suspender opcionalmente pero preferentemente, preferentemente en un medio de crecimiento adecuado para CEMs, como se describe en la presente memoria descriptiva. A continuación, las células no adherentes resuspendidas se utilizan opcionalmente para ser añadidas al principio del siguiente pasaje de cultivo.

Los pasajes se numeran consecutivamente como se describe en detalle a continuación, comenzando por el pasaje 0 (P0). P0 es el primer pasaje después de la obtención de las células, preferentemente por digestión enzimática como se ha descrito anteriormente. De este modo, P0 puede denominarse "cultivo primario". Las células para la inoculación del primario proceden de la Jalea de Wharton del cordón umbilical, de tejido disociado mecánica y/o enzimáticamente, como se ha descrito anteriormente, o -alternativamente pero mucho menos preferente- de un brote de células migratorias del tejido estromal de la Jalea de Wharton.

Al cultivar las células en varios pasajes, las células pueden expandirse a números totales de células más altos y/o mayor homogeneidad y/o menor contaminación por células no deseadas que lo que sería posible en un solo pasaje. Las células pueden expandirse en condiciones definidas o en otras condiciones deseadas.

Generalmente se reconoce que las células estromales del cordón umbilical (CU) son heterogéneas en cuanto a estructura, propiedades biológicas y localización dentro del CU. Por ejemplo, la Fig. 7A muestra que las células

derivadas de CU recién aisladas, tanto de acuerdo con la descripción de la presente memoria descriptiva y de acuerdo con el estado de la técnica, son heterogéneas en cuanto a la visualización de ciertos marcadores de superficie.

5 Es típico que no todas las células aisladas del estroma de la Jalea de Wharton (ni de ninguna otra zona del cordón umbilical) sean clonogénicas. En otras palabras, no todas las células aisladas son unidades formadoras de colonias (UFC). Sin embargo, cultivando las células aisladas de acuerdo con la presente invención durante múltiples pasajes, se pueden enriquecer las células estromales mesenquimales deseadas, que son clonogénicas. De este modo, en una realización, la expansión de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque el porcentaje de CEMs aumenta con el tiempo. Por ejemplo, el porcentaje de CEMs al final de P0 puede ser típicamente mayor que el porcentaje de CEMs al principio de P0.

10 En la presente invención, los pasajes de cultivo múltiples confieren la ventaja de que las CEM pueden enriquecerse, con respecto a otras células (no deseadas o contaminantes), tal como los glóbulos rojos, porque (a) las células no adherentes (y por tanto no CEM) se eliminan junto con el medio de crecimiento al final de un pasaje de cultivo, (b) las células con propiedades proliferativas inferiores a las CEM no proliferarán sustancialmente tan bien como las CEM, y de este modo, en el transcurso de varios pasajes acumulativos, la población celular se enriquece en CEM, y finalmente
15 (normalmente a partir de P1) es sustancialmente pura para CEM.

Generalmente es posible convertir aritméticamente el número de pasaje en duplicaciones acumulativas de la población, siempre y cuando se utilicen condiciones definidas o bien establecidas de otra manera.

Las células se expanden preferentemente en múltiples pasajes, preferentemente más de uno a menos de catorce pasajes. Por ejemplo, las células se cultivan durante tres a seis pasajes.

20 En una realización precisa, las células recién aisladas son, después de la digestión enzimática, inicialmente sometidas a un pasaje de cultivo primario (para una ilustración ejemplar ver Ejemplo 2B) - el pasaje de cultivo primario puede ser referido como P0; opcionalmente la expansión es repetida en un nuevo pasaje bajo condiciones para P0 (el pasaje de cultivo repetido es entonces referido como P0+). Los pasajes posteriores, es decir, los que siguen directamente a P0, o a P0+, se numeran como P1, P2, etcétera. En una realización preferente, las células se expanden al menos hasta
25 P2 y no más que hasta P6. En una realización preferente, las células se expanden hasta P4.

Con respecto a las Duplicaciones Acumulativas de la Población, típicamente es difícil determinar las Duplicaciones Acumulativas de la Población durante P0. La razón principal es que, de acuerdo con la experiencia de los presentes inventores, no todas las células sembradas al principio de P0 se expandirán. Para determinar los Duplicados de Población acumulativos durante P0, se requeriría determinar el número o fracción de células clonogénicas al comienzo de P0, es decir, aquellas células que son capaces de expandirse, dando origen de este modo a células hijas. Aunque tal determinación no es generalmente inviable, no es necesaria para el procedimiento de la presente invención; en su lugar, en tales realizaciones, se determinan las Duplicaciones de Población acumulativas para todos los pasajes excepto P0. Mientras que las células aisladas originalmente del cordón umbilical comprenden típicamente CEMs, que son clonogénicas, de este modo como otras células (por ejemplo, glóbulos rojos), que no son clonogénicas, las otras
30 células sustancialmente no estarán presentes más allá de P0, como se describe a continuación, *entre otras cosas*, porque dichas células no clonogénicas no generan descendencia durante P0.

En una realización, las células son expandidas por 5 a 30 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0), tal como 8 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). En una realización preferente, las células se expanden durante sólo 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). Esta realización es adecuada para la creación de un Banco de Células Primarias.
40

En una realización preferente alternativa, las células se expanden durante 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). Esta encarnación es adecuada para la creación de un Banco de Células Secundario.

45 En la experiencia de los inventores, los Duplicados de Población acumulados durante P1 y P2 (total de P1 más P2, pero sin incluir P0), como regla muy general, están normalmente en el intervalo de 7 a 15, preferentemente de 9 a 13. De acuerdo con la experiencia de los inventores, los Duplicados de Población acumulados durante P3 y P4 (total de P3 más P4, pero sin incluir P0, P1 y P2), como regla muy general, están normalmente en el intervalo de 4 a 12, preferentemente 6-10. En consecuencia, las Duplicaciones de Población acumuladas durante P1, P2, P3 y P4 (total de P1 más P2 más P3 más P4, pero sin incluir P0), como regla muy general, se sitúan normalmente en el intervalo de
50 9 a 27, preferentemente en el intervalo de 15 a 23. Estas cifras no incluyen las duplicaciones de población acumuladas durante P0.

Al principio de cada pasaje, las células se transfieren a un recipiente de cultivo celular. Preferentemente, las células se transfieren en una cantidad específica de células por recipiente de cultivo. La cantidad se define preferentemente en función de la superficie bidimensional del recipiente de cultivo celular. De este modo, es posible iniciar el pasaje con una densidad celular definida. Las densidades celulares para iniciar pasajes de cultivo en el contexto de la presente invención son las siguientes:
55

ES 2 985 827 T3

	Para iniciar P0 y P0+	Para iniciar P1 y todos los pasajes posteriores a P1
Intervalo adecuado	1.000 - 50.000 células/cm ²	200 - 50.000 células/cm ²
Intervalo preferente	8.000 células/cm ² o más	2.000 - 3.000 células/cm ²
Valor definido	No aplicable	2.500 células/cm ²

Al comienzo de cada P0 y P0+ (si procede), se siembra el total de células disponibles. Por lo tanto, no se ha definido con exactitud la densidad celular para iniciar P0 y P0+ (si procede). En cualquier caso, la densidad celular para iniciar P0 y P0+ (si procede), debe ser de 8.000 células/cm² o superior.

- 5 Como es común para las células estromales mesenquimales, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es típicamente una célula adherente cuando se cultiva en un recipiente de cultivo, particularmente un recipiente de cultivo con una superficie de suelo de plástico. Preferentemente, la célula es adherente independientemente de la elección del medio de crecimiento. En cualquier caso, es muy preferente que la célula sea adherente cuando se cultiva en un medio de crecimiento preferente de acuerdo con la presente invención.
- 10 Al final de cada pasaje, se cosechan las células. Para ello, opcionalmente pero Preferentemente, se desprenden enzimáticamente, tal como por medio de tripsinización. Como es comúnmente conocido, la tripsina es una enzima comercialmente disponible adecuada para digerir proteolíticamente las moléculas de adherencia celular, y de este modo separar las células adherentes del recipiente de cultivo y entre sí. "tripsinizado" significa, por tanto, tratado con tripsina -o cualquier otra enzima con un patrón de digestión similar a la tripsina- en condiciones adecuadas para dicha digestión. Los procedimientos estándar para tripsinizar células de mamíferos, en particular células mesenquimales, también son adecuados para tripsinizar las células obtenidas como se describe en la presente memoria descriptiva. Los preparados de tripsina para tales fines están disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente, el desprendimiento enzimático se realiza con una enzima adecuada distinta de la tripsina.
- 15
- 20 Tras el desprendimiento enzimático, por ejemplo por tripsinización, se determina, opcional pero preferentemente, el número total de células (por matraz o por placa o por pila o por total de todos los recipientes de cultivo utilizados en ese pasaje respectivo).
- 25 Cuando en la presente memoria descriptiva se dice que las células se expanden hasta un cierto pasaje, por ejemplo hasta P4, entonces se quiere decir que la expansión de las células no continúa o se interrumpe después de ese pasaje respectivo.

Después de cada pasaje, se evalúan preferentemente los siguientes criterios de aceptación: 1 rendimiento, 2 viabilidad, 3 confluencia, 4 morfología. La determinación de los criterios de aceptación 3 y 4 se produce antes del desprendimiento enzimático de las células. La determinación de los criterios de aceptación 1 y 2 se produce tras el desprendimiento enzimático de las células. Los detalles son los siguientes.

Criterio de aceptación		Después de P0 y P0+	Después de P1 y todos los pasajes siguientes a P1	Prueba
1	Rendimiento (funcionamiento a escala completa)	Véase el ejemplo 2B	Véase el ejemplo 2C	Recuento de células tras desprendimiento enzimático
2	Viabilidad	Más del 80 % de células viables	Más del 80 % de células viables	Tinción con 7-amino actinomicina D (7-AAD) tras desprendimiento enzimático
3	Confluencia	Al menos 80 %, preferentemente 80 a 90 % de confluencia	Al menos 80 %, preferentemente 80 a 90 % de confluencia	Determinación microscópica
4	Morfología	Mayoría de células pequeñas, fusiformes y en colonias definidas	Mayoría de células pequeñas, fusiformes y en colonias definidas	Determinación microscópica

30

Preferentemente, deben cumplirse los cuatro criterios de aceptación.

La determinación microscópica de la confluencia está dirigida a determinar el porcentaje de la superficie del recipiente de cultivo celular que está cubierta por células adheridas al mismo.

Si no se cumple el criterio de confluencia, las células se expanden más, y se observan regularmente para averiguar en qué momento se cumple el criterio de confluencia.

- 5 Para determinar el rendimiento, las células se desprenden enzimáticamente, por ejemplo sometiéndolas a tripsinización, y una fracción definida de la suspensión que contiene células se somete a recuento celular automatizado, como por ejemplo por medio del NucleoCounter®. A continuación, se determina aritméticamente el número total de células en función de la fracción.

- 10 La determinación microscópica de la morfología (es decir, la morfología celular) está dirigida a determinar la forma de las células adheridas a la superficie base del recipiente de cultivo celular. Es típico de las CEM que la mayoría de las células tengan forma de huso. A título ilustrativo, en la Fig. 5 C se muestra una fotografía que muestra una vista sobre la superficie base de una placa de cultivo celular que contiene dichas células (panel denominado "JWE").

- 15 La determinación de la viabilidad garantiza que las células que se someten a la preparación de un banco celular y/o a un pasaje posterior son aptas para una expansión posterior (tras la congelación y descongelación, de acuerdo con sea el caso). Las células descritas en la presente memoria descriptiva son superiores en viabilidad en comparación con las CEM aisladas de acuerdo con procedimientos acordes con el estado de la técnica. De este modo, y basándose en la expansión de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener grandes poblaciones celulares incluso cuando el número total de células aisladas inicialmente de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical es relativamente bajo. De este modo, las células obtenibles de acuerdo con la presente descripción son superiores en su potencial proliferativo.

Congelación

Las células pueden ser congeladas, por ejemplo, congeladas en nitrógeno líquido, de acuerdo con procedimientos estándar. Es muy posible descongelar dichas células congeladas y, por ejemplo, someterlas a nuevos pasajes de cultivo tras la descongelación. La congelación puede producirse como lote completo o en alícuotas.

- 25 Cuando en la presente memoria descriptiva se dice que las células se expanden hasta un cierto pasaje, por ejemplo hasta P4, entonces se quiere decir que la expansión de las células no continúa más, o se interrumpe, después de ese pasaje respectivo. Una forma de realización ejemplar pero típica es que las células se congelen después de la etapa respectivo. Es posible que se produzcan congelaciones repetidas tras repetidos pasajes. Por ejemplo, las células pueden congelarse después de P2 y/o después de P4. Preferentemente, las células se congelan después de P2 y después de P4.

Las células congeladas y las poblaciones de células congeladas también son objeto de la presente descripción. Las poblaciones de células congeladas pueden denominarse bancos celulares. A continuación se describirán bancos de células adecuados que pueden obtenerse en el contexto de la presente descripción.

- 35 En una realización, las células son congeladas después de 5 a 30 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0), tal como 8 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). En una realización preferente, las células se congelan después de sólo 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). Esta realización es adecuada para la creación de un Banco de Células Primarias. En una realización preferente alternativa, las células se congelan después de 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0). Esta encarnación es adecuada para la creación de un Banco de Células Secundario.

- 45 Los procedimientos estándar para la congelación de células de mamíferos, particularmente células mesenquimales, son adecuados para congelar las células obtenidas de acuerdo con la presente descripción. Preferentemente, las células se congelan a temperaturas de -70 °C o inferiores (como -80 °C), opcionalmente precedidas de una congelación rápida a temperaturas de -190 °C o inferiores. En una realización, las células se congelan en nitrógeno líquido.

- 50 Las células congeladas pueden, opcional pero preferentemente, almacenarse congeladas. Los procedimientos estándar de almacenamiento de células de mamíferos, en particular de células mesenquimales, son adecuados para almacenar las células obtenidas De acuerdo con la presente descripción. Es preferente congelar las células en viales. En una realización, las células congeladas se almacenan en nitrógeno líquido.

- 55 En una realización preferente, las células son alícuotadas antes de la congelación. Los recipientes adecuados para contener alícuotas de las células obtenibles de acuerdo con la presente descripción son todos los recipientes adecuados para recibir cantidades respectivas (alícuotas) de células, y para su almacenamiento a bajas temperaturas, en particular viales. Un vial (también conocido como frasco) es un pequeño recipiente o botella de vidrio o plástico, adecuado para almacenar líquidos. La naturaleza del vial adecuado en la presente descripción no está particularmente limitada a condición de que permita contener las células en el medio indicado, y a condición de que sea adecuado

para ser congelado en condiciones en las que las células permanezcan en un estado que permita su posterior descongelación y subcultivo. Para ello, los viales deben ser aptos para la congelación (crioviales). Los viales pueden estar hechos de cualquier material adecuado, aunque los más típicos son los de vidrio y los de plástico como el polipropileno. El vial puede cerrarse, para lo cual suele tener una tapa, y un criovial adecuado para su uso de acuerdo con la presente descripción es preferentemente adecuado para la congelación a temperaturas de - 196 °C o inferiores. Las opciones de tapa incluyen viales de rosca (cerrados con un capuchón de rosca o cuentagotas/pipeta), viales de labios (cerrados con un capuchón de corcho o plástico) y viales de engarce (cerrados con un capuchón de goma y una tapa metálica) o, en el caso de los viales de plástico, también "capuchones de bisagra" (snap caps), que se cierran a presión. Es preferente que el fondo del vial sea plano, aunque no es un requisito estricto. Preferentemente, todos los viales utilizados en un determinado proceso de aislamiento/expansión son idénticos entre sí y se llenan con volúmenes idénticos de líquido que contiene células (células en medio, normalmente en suspensión, pero esto no es un requisito).

Los viales preferentes tienen un tamaño adecuado para contener entre 2 y 10 ml de células en medio (típicamente en suspensión, pero esto no es un requisito), tal como entre 3 y 8 ml de células en medio, y más preferentemente ca. 4 ml de células en medio. Los viales preferentes tienen un tamaño adecuado para contener entre 10^6 y 10^9 células en medio, por ejemplo entre 10×10^6 y 100×10^6 células en medio, y más preferentemente unas 20×10^6 células, en medio.

Las células congeladas y/o almacenadas pueden opcional pero preferentemente ser descongeladas. Tras la descongelación, las células pueden someterse opcionalmente a un nuevo cultivo (subcultivo), incluida la expansión. Los procedimientos estándar de descongelación y opcionalmente de subcultivo, en particular de células mesenquimales, son adecuados para descongelar las células obtenidas de acuerdo con la presente descripción. Para el cultivo posterior, o subcultivo, son adecuados los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva, incluidos los medios de crecimiento, etc.

En una realización preferente, las células se congelan tras el pasaje 2 (P2). Las células obtenidas y congeladas después de P2 se denominan en la presente memoria descriptiva "Banco de Células Primarias" o "BCP", o alternativamente "Banco de Células Maestras". En una realización preferente, el Banco de Células Primarias comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

En otra realización preferente, las células se congelan después del pasaje 4 (P4). Las células obtenidas y congeladas después de P4 se denominan en la presente memoria descriptiva "Banco Celular Secundario" o "BCS", o alternativamente "Banco Celular de Trabajo". En una realización preferente, el Banco de Células Secundario comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

Preferentemente, la realización de la BCP y la realización de la BCS están unidas, de forma que las células se congelan primero como una BCP, y posteriormente, toda o parte de la BCP se descongela y se subcultiva, y a continuación la BCS se obtiene después de dos pasajes adicionales (P4 en total). Preferentemente, no todas las células obtenidas y congeladas después de P2, por ejemplo, no toda la BCP, se descongelan y subcultivan juntas. Más bien, lo más preferente es que un recipiente (normalmente un vial) obtenido y congelado como BCP se descongele y subcultive, mientras que los demás recipientes (viales) permanecen congelados como BCP.

Es importante señalar que las referencias a pasajes individuales se dan en la presente memoria descriptiva con fines orientativos. Por ejemplo, también es posible preparar la BCP después de una etapa distinta de P2. La preferencia por preparar la BCP después de P2 y la BCS después de P4 se basa en la experiencia con el crecimiento en un medio basado en el medio basal MBQDCM, o un medio basal sustancialmente equivalente al mismo, en las condiciones de cultivo descritas específicamente en los ejemplos experimentales (particularmente el Ejemplo 2). Cuando se utilizan otras condiciones de cultivo, lo que es igualmente posible en el contexto de la presente invención, entonces la BCP y la BCS se preparan idealmente después de Duplicaciones de Población acumulativas que corresponden a las Duplicaciones de Población acumulativas observadas después de P2 y P4, respectivamente, en los ejemplos experimentales del presente documento, en particular el Ejemplo 2C. El aislamiento de una célula individual, si se desea, puede lograrse, por ejemplo, por medio de dilución en serie, antes o después de la expansión. A menos que dicho aislamiento se realice específicamente, el procedimiento de la invención produce una población de células estromales mesenquimales. Como se describe a continuación, el rendimiento puede ser relativamente alto, en comparación con los procedimientos conocidos anteriormente, *entre otras cosas*, en vista de la viabilidad superior y las propiedades de expansión de las células como se describe en la presente memoria descriptiva.

Rendimiento

El procedimiento de acuerdo con la presente invención, que comprende la etapa (c), produce una población de células estromales mesenquimales. Dicha población de células estromales mesenquimales se describe en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, el procedimiento de la presente invención proporciona una población celular desprovista de células sanguíneas. En la presente memoria descriptiva se describen con más detalle las poblaciones celulares obtenidas por medio del procedimiento de la invención.

En una realización preferente, las células producidas durante la expansión de acuerdo con la presente invención son alicuotadas y opcionalmente congeladas. Un momento adecuado para alicuotar y congelar las células es después de la finalización de cualquier pasaje, y la posterior separación enzimática, por ejemplo, tripsinización, centrifugación y resuspensión en medio de crecimiento. Las células (población celular) así obtenidas y almacenadas por congelación, preferentemente en alícuotas, también pueden denominarse banco celular.

En una realización preferente, las células se congelan después de P2. Las células (población celular) así obtenidas y almacenadas por congelación, preferentemente en alícuotas, también pueden denominarse Banco de Células Primarias. En una realización preferente, el Banco de Células Primarias comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

En una realización preferente adicional, pero no mutuamente excluyente, las células se congelan después de P4. Las células (población celular) así obtenidas y almacenadas por congelación, preferentemente en alícuotas, también pueden denominarse Banco Celular Secundario. En una realización preferente, el Banco de Células Secundario comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

Las alícuotas congeladas así obtenidas del banco celular respectivo están disponibles para descongelación individual en el momento deseado. En otras palabras, no es necesario -y normalmente no se desea- descongelar todas las alícuotas del banco de células en el mismo momento. Por el contrario, la alícuota y la congelación individual de las alícuotas proporciona la ventaja de que las alícuotas individuales pueden ser retiradas de la congelación, descongeladas y sometidas a cultivo adicional (subcultivo, expansión adicional) en puntos individuales e individualmente deseados en el tiempo.

Una ejecución a escala completa que comienza con cordón umbilical humano y comprende la etapa (c) y se ejecuta hasta el pasaje P2 típicamente produce un Banco de Células Primarias (BCP) de al menos 1×10^9 células, más preferentemente al menos 2×10^9 células, más preferentemente al menos 3×10^9 células, más preferentemente al menos 4×10^9 células, más preferentemente al menos 5×10^9 células, más preferentemente al menos 6×10^9 células, más preferentemente al menos 7×10^9 células, más preferentemente al menos 8×10^9 células, más preferentemente al menos 9×10^9 células, y en algunas realizaciones al menos 10×10^9 células. En una realización preferente, el Banco de Células Primarias comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

Debido a las excelentes propiedades proliferativas de las células descritas en la presente memoria descriptiva, las células pueden cultivarse, sin embargo, mucho más allá de P2. Esto puede ocurrir ya sea pasando algunas o todas las células obtenidas durante P2, después del desprendimiento enzimático (por ejemplo, tripsinización) a un pasaje posterior (P3), o creando un Banco de Células Primarias después de P2 y a continuación descongelando uno o más viales de células del Banco de Células Primarias en un momento deseado, para iniciar de este modo un pasaje posterior (P3). En cualquier caso, P3 puede ir seguido de uno o más pasajes adicionales y, opcionalmente, puede generarse un banco de células secundarias, por ejemplo, después de P4. Debido a las excelentes propiedades proliferativas, el número total de células después de un pasaje posterior, por ejemplo P4, será normalmente significativamente mayor que el número total de células después de P2, para el que los rendimientos típicos se indican más arriba. Por ejemplo, después de P4, el rendimiento total de las células puede ser al menos 10 veces mayor que después de P2, pero más típicamente entre 100 veces y 1000 veces mayor que después de P2. En algunas realizaciones, después de P4, el rendimiento total puede ser de al menos 10×10^{12} células, con respecto a una ejecución a escala completa. Opcionalmente, se prepara un banco de células secundario siguiendo P4. En una realización preferente, dicho Banco Celular Secundario comprende o consiste en células que han sido congeladas después de 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

El rendimiento puede incrementarse opcionalmente por medio de un subcultivo adicional, por ejemplo, el pasaje P5 y posteriores.

Potencial de diferenciación

La potencia de las células descritas en la presente memoria descriptiva puede evaluarse experimentalmente. En general, esto se hace sometiendo una célula a condiciones en las que se favorece la diferenciación en uno o más tipos celulares específicos.

Preferentemente, la(s) célula(s) obtenida(s) tras la etapa (c) es(son) al menos multipotente(s), y opcionalmente pluripotente(s). En una realización típica, la(s) célula(s) obtenida(s) tras la etapa (c) es(son) multipotente(s). La multipotencia puede comprobarse por medio de ensayos de diferenciación, como se conoce comúnmente en la técnica. En condiciones especiales, una célula multipotente se diferenciará en tejidos (adipogénico, condrogénico y osteogénico). Los ejemplos 12, 13 y 14 demuestran que las células descritas en la presente memoria descriptiva tienen tales capacidades. En condiciones especiales, la célula se diferenciará en tejidos de diferentes tejidos (adipogénico, condrogénico y osteogénico). Preferentemente, una célula multipotente obtenible por medio de la descripción del

presente documento tiene al menos todos los potenciales de diferenciación siguientes: (a) adipogénico; (b) condrogénico; (c) osteogénico. Los ejemplos 12, 13 y 14 demuestran que la célula descrita en la presente memoria descriptiva tiene tales capacidades. En estos ejemplos, en particular en el Ejemplo 12, se describen condiciones específicas que permiten la diferenciación a pesar de la rápida expansión de las células estromales derivadas de la Jalea de Wharton tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

Opcionalmente, la célula tiene otros potenciales de diferenciación se seleccionan entre los potenciales de diferenciación típicos de las células estromales mesenquimales. Sin embargo, como es típico de las células estromales mesenquimales, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no suele ser totipotente.

Sin embargo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es típicamente totipotente. No obstante, la célula puede someterse opcionalmente a manipulación genética y/o reprogramación nuclear, con lo que se puede influir en el potencial de diferenciación.

Relación con otras descripciones

Por el procedimiento de la invención, se puede obtener una célula, como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. Por medio del procedimiento de la invención, puede obtenerse una población celular, tal como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, por medio del procedimiento de la invención, se puede obtener un banco de células. En una realización, se puede obtener un banco de células por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En esa realización, la etapa (c) del procedimiento de la invención es seguida opcionalmente por una etapa (d) de alicotar las células y una etapa (e) de almacenar las células. Las células pueden almacenarse en cualquier condición adecuada, aunque la congelación a temperaturas de 180 °C o menos es lo más típico. Las células pueden congelarse, preferentemente en nitrógeno líquido. Puede añadirse un crioprotector antes de la congelación.

Dado que los aspectos de la presente invención están relacionados entre sí, las realizaciones descritas con respecto a las descripciones del presente documento también pueden leerse en el primer aspecto, y viceversa. Por ejemplo, al mostrar la ausencia sustancial de proteínas marcadoras endoteliales, por medio de perfiles de expresión o determinación de marcadores de superficie, como se describe en la presente memoria descriptiva, se puede confirmar experimentalmente que se ha aplicado correctamente un aspecto del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, a saber, la eliminación del epitelio.

Es particularmente preferente que la población celular obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la invención sea una población celular como se describe más adelante. También es particularmente preferente que el procedimiento para obtener una célula de acuerdo con el primer aspecto de la invención produzca una célula como la descrita en la presente memoria descriptiva; por lo tanto, todos los rasgos que se describen en la presente memoria descriptiva como característicos de la célula descrita en la presente memoria descriptiva también son adecuados para caracterizar el procedimiento para obtener la célula de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. También es particularmente preferente que la célula obtenible por el procedimiento del primer aspecto de la invención sea una célula como se describe en la presente memoria descriptiva, como sigue.

Célula estromal mesenquimal

Una descripción más detallada se relaciona con una célula mesenquimal. Más concretamente, la célula mesenquimal es una célula estromal mesenquimal (CEM). A continuación se describen los rasgos de la célula.

Algunas características de la célula descrita en la presente memoria descriptiva, que se describirán a continuación, están relacionadas con las características físicas de la célula descrita en la presente memoria descriptiva. A título meramente ilustrativo, y sin perjuicio de los detalles desvelados en otras partes de la presente memoria descriptiva, las características físicas incluyen aquellas características que pueden determinarse directamente con procedimientos físicos, tales como la expresión génica, el tamaño, la forma, etc. de la célula. Algunas características y descripciones de la célula descrita en la presente memoria descriptiva, que se describirán a continuación, están relacionadas con el procedimiento por medio del cual se puede obtener u obtener la célula descrita en la presente memoria descriptiva. A título meramente ilustrativo, y sin perjuicio de los detalles desvelados en otras partes de la presente memoria descriptiva, las características de la célula relacionadas con el procedimiento por medio del cual se puede obtener la célula descrita en la presente memoria descriptiva pueden incluir (a) el origen anatómico de la célula, en particular el cordón umbilical y el estroma de la Jalea de Wharton como sección preferente de la misma, (b) las condiciones aplicadas para aislar la célula y, opcional pero preferentemente, también (c) las condiciones aplicadas para expandir la célula.

Célula aislada

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula aislada, en particular una célula estromal mesenquimal aislada. En particular, la célula estromal mesenquimal descrita en la presente memoria descriptiva es preferentemente una célula estromal mesenquimal aislada procedente de la zona intervascular (véase la Fig. 1) del cordón umbilical, o derivada de una célula de este tipo. Una célula estromal aislada puede obtenerse del estroma por medio de un procedimiento que comprenda el aislamiento tal como se describe en la presente memoria

descriptiva. De una célula de este tipo puede derivarse una célula por expansión. De este modo, en general, cuando se dice que una célula determinada es "derivada de" otra célula, se quiere decir que la célula determinada se originó a partir de dicha otra célula, por expansión (división celular) y/o diferenciación.

5 También se describe que la célula es una célula aislada que se encuentra fuera de un cuerpo humano o animal. Una célula aislada es generalmente una célula fuera de su entorno fisiológico *in vivo*. Preferentemente, la célula es una célula *ex vivo*. En particular, la célula *ex vivo* se localiza preferentemente fuera del cordón umbilical. En particular, es preferente que la célula *ex vivo* no esté en contacto con vasos sanguíneos, ya sea contacto directo o indirecto. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se encuentra en un recipiente de cultivo. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se encuentra en un recipiente apto para el almacenamiento, como un vial. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se encuentra a una temperatura de unos 35 °C a 39 °C, preferentemente en un recipiente de cultivo. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se encuentra en un recipiente apto para la criopreservación, como un criovial, preferentemente a una temperatura de -180 °C o inferior. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se encuentra en un recipiente de cultivo. También se ha descrito que la célula *ex vivo* es una célula metabólicamente activa. También se ha descrito que la célula *ex vivo* se congela.

15 También se describe que la célula se caracteriza por al menos un rasgo - estructural o funcional - que no se encuentra normalmente en una célula del cordón umbilical humano. Por ejemplo, dicha característica puede ser un rasgo específica del procedimiento por medio del cual se puede obtener la célula descrita en la presente memoria descriptiva. Dicha característica estructural o funcional puede seleccionarse entre los rasgos descritos explícitamente en la presente divulgación, y/o entre rasgos no descritos explícitamente en la presente divulgación, pero inherentes a la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, inherentes a la célula obtenible por el procedimiento de la invención. También se ha descrito que la célula es una célula adherente, por ejemplo, adherente a un recipiente de cultivo, como un recipiente de cultivo con una superficie esmerilada de plástico.

25 Una célula estromal aislada como la descrita en la presente memoria descriptiva puede expandirse *in vitro* por medio de cultivo. De este modo se puede obtener una célula derivada. La célula derivada también es una célula tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, a condición de que cumpla las características que definen a la célula tal y como se describe en la presente memoria descriptiva. De este modo, debido a las propiedades similares a las células madre de la célula descrita en la presente memoria descriptiva, se pueden cubrir múltiples generaciones de células. Se pueden obtener múltiples generaciones por medio de la expansión descrita en la presente memoria descriptiva. De hecho, una descripción específica de la célula, tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, incluye la expansión de la célula *ex vivo*. De este modo, aunque la célula esté aislada, es capaz de dar descendencia a células iguales o similares, y generar de este modo una población celular. Dicha población celular se describe en la presente memoria descriptiva. Las condiciones de cultivo adecuadas no están particularmente limitadas, pero incluyen las descritas en el primer aspecto de la invención.

35 Un procedimiento adecuado pero no limitante para el aislamiento de una célula, incluyendo el tratamiento enzimático, se describe en la presente memoria descriptiva en el contexto del primer aspecto de la presente invención. El aislamiento de células individuales, si se desea, puede lograrse, por ejemplo, por medio de dilución en serie. De este modo, preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula en un entorno *ex vivo*, como *in vitro*. El experto puede practicar varios procedimientos para cultivar células *in vitro*, incluidos los descritos con respecto al primer aspecto de la presente invención.

40 En general, una célula estromal mesenquimal puede originarse de varios tejidos, como la médula ósea, el tejido adiposo y el cordón umbilical. Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva procede o se deriva del cordón umbilical, más preferentemente de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical. Sin embargo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no procede de la sangre del cordón umbilical. La célula tampoco es epitelial ni endotelial.

45 También se describe que la célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula recién aislada. Una célula recién aislada es una célula que se ha obtenido directamente por aislamiento del tejido del que procede, tal como por el procedimiento descrito anteriormente. Sin embargo, es más preferente que la célula descrita en la presente memoria descriptiva sea una célula derivada de una célula recién aislada, normalmente por medio de expansión *in vitro*. No hay limitación como tal en el número de pasajes o Duplicaciones de Población acumulativas *in vitro*, tras el aislamiento fresco de una célula; sin embargo, típicamente la célula como se describe en la presente memoria descriptiva se deriva de una célula recién aislada por expansión *in vitro* durante 12 pasajes o menos, o un número equivalente de duplicaciones de población acumulativas. En general, cualquier célula que cumpla las limitaciones reivindicadas es una célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva, independientemente del número de pasajes o duplicaciones poblacionales acumulativas por las que se haya obtenido, tras su aislamiento en fresco a partir del tejido de origen.

60 Como es común para las células estromales mesenquimales, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es típicamente una célula adherente cuando se cultiva en un recipiente de cultivo, particularmente un recipiente de cultivo con una superficie de suelo de plástico. De este modo, también descrita, la célula estromal mesenquimal tal como se describe en la presente memoria descriptiva es una célula adherente a la superficie, particularmente una célula adherente al plástico *in vitro*. Si se desea, una célula plástico-adherente puede separarse

del recipiente de cultivo, por ejemplo, por medio de tripsinización. De este modo, se obtiene una célula no adherente. La descripción comprende también una célula no adherente de este tipo.

5 También se ha descrito que la célula estromal mesenquimal descrita en la presente memoria descriptiva tiene forma de huso. Esto se aplica normalmente cuando la célula estromal mesenquimal está adherida a un recipiente de cultivo, tal como un recipiente de cultivo con una superficie de suelo de plástico. En particular, en una población de células estromales mesenquimales, la mayoría, por ejemplo el 50 % o más por número de células, tienen normalmente forma de huso, en particular cuando se adhieren a una superficie de plástico *in vitro*.

10 Cuando la célula como se describe en la presente memoria descriptiva no es adherente, por ejemplo cuando ha sido enzimáticamente desprendida como por ejemplo tripsinizada, como por ejemplo cuando está presente en un Banco de Células Primario o Secundario, opcionalmente congelada, la célula no tiene normalmente forma de huso. De este modo pues, la forma fusiforme se asocia específicamente con la adherencia a la superficie en condiciones de cultivo.

15 También se describe, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es obtenible por el procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención. En dicha descripción, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se selecciona adecuadamente entre una célula recién aislada, es decir, una célula que no ha sido sometida a expansión *ex vivo*, o una célula expandida, es decir, una célula obtenible por expansión *ex vivo* de una célula previamente recién aislada.

Expresión génica y visualización de antígenos de superficie

20 La célula descrita en la presente memoria descriptiva puede caracterizarse por un patrón de expresión génica. Tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "patrón de expresión génica" significa que al menos un gen se expresa, o no se expresa, o se expresa a un determinado nivel, de acuerdo con el caso. De este modo, el hecho de que este gen en particular se exprese, o no se exprese, o se exprese a un determinado nivel, caracteriza a la célula tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, a efectos de distinción de una célula de referencia. Lo mismo se aplica a la expresión de más de un gen, tal como por ejemplo dos genes, tres genes, cuatro genes, cinco genes, seis genes, siete genes, ocho genes, nueve genes, diez genes, etc. Cuando la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por la expresión de uno o más genes, no se desea hacer una declaración específica sobre la expresión de cualquier otro gen no mencionado en ese contexto. A modo de ejemplo ilustrativo, a condición de que se diga en la presente memoria descriptiva que la célula descrita expresa APCDD1, esto no debe interpretarse como una afirmación de que cualquier otro gen específico también se expresa, o no se expresa, o se expresa a un determinado nivel, a menos que el contexto indique lo contrario.

30 En general, la expresión de un gen puede ser probada por varios procedimientos, tanto a nivel de ácido nucleico como a nivel de proteína. La expresión génica puede probarse con relativa frecuencia en biología molecular, bioquímica y biología celular, y en el contexto de la presente descripción puede utilizarse cualquier procedimiento conocido o adecuado para ello. A continuación se describen algunos procedimientos. Los procedimientos relativos a la expresión génica también pueden denominarse procedimientos transcriptómicos. Por lo tanto, el perfil de expresión génica de una célula también puede denominarse transcriptoma. Asimismo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por su perfil de expresión génica.

35 Se pueden utilizar diferentes términos para describir que la expresión de un gen está siendo analizada: por ejemplo, se puede decir que la expresión está siendo probada, analizada, evaluada, ensayada, medida, determinada, etc. Estos términos incluyen tanto la determinación cualitativa, es decir, la cuestión de si el gen respectivo se expresa o no, como la determinación cuantitativa, es decir, la cuestión de a qué nivel se expresa el gen respectivo.

40 Típicamente, para la determinación de la expresión génica, se toma una muestra de una célula o de una multitud de células (lo que es preferente) de una población celular, y posteriormente se analiza la expresión génica en dicha muestra, pudiendo destruirse o no las células de dicha muestra, según sea el caso. Dado que la población celular descrita en la presente memoria descriptiva es normalmente homogénea, lo que significa que prácticamente todas las células individuales que la componen son muy parecidas o similares, el resultado sobre la expresión génica en las células que componen la muestra tomada de la población celular (muestra representativa) normalmente se aplicará también a las células restantes de dicha población, a menos que el contexto dicte lo contrario y/o la población celular no parezca ser sustancialmente homogénea.

45 La determinación de la expresión de cualquier gen respectivo puede ser una determinación no dirigida, es decir, en la que la expresión génica se ensaya en general (por ejemplo, por medio de un enfoque amplio tal como la micromatriz) sin centrarse en un gen, o una determinación dirigida, en la que se ensaya específicamente si el gen respectivo se expresa. En el segundo caso en particular, también puede decirse que el gen respectivo es un "gen de interés".

50 Se pueden utilizar varias tecnologías transcriptómicas para generar los datos para el análisis de la expresión génica. Por ejemplo, las micromatrices de ADN miden la actividad relativa de genes diana previamente identificados. Las técnicas basadas en secuencias, como ARN-Sec, proporcionan información sobre las secuencias de los genes además de su nivel de expresión.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula de un animal placentario, preferentemente mamífero, preferentemente primate, más preferentemente humano. Por lo tanto, también se describe, las células estromales mesenquimales (CEMs) como se describe en la presente memoria descriptiva es una célula de mamífero. Por lo tanto, a menos que se especifique lo contrario, todas las indicaciones a un gen específico se relacionan con el gen de mamífero respectivo.

Más preferentemente, la célula estromal mesenquimal como se describe en la presente memoria descriptiva es una célula de un primate, más particularmente de un humano. De este modo, más preferentemente, las células estromales mesenquimales (CEMs) descritas en la presente memoria descriptiva son células humanas. Por lo tanto, en esa descripción, todas las indicaciones a un gen específico se relacionan con el gen humano respectivo. En algunos casos esto se desprende directamente del contexto, tal como en el caso de los antígenos leucocitarios humanos (ALH), en otros casos esto no se dice específicamente en el contexto; sin embargo es evidente: por ejemplo, con referencia a una célula humana, expresión de APCDD1 significa expresión de APCDD1 humano, etc. Como la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva es, en una descripción preferente, una célula humana, es preferente que la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva en dicha descripción exprese APCDD1 humano.

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula transgénica. Por lo tanto, todas las indicaciones relativas a la expresión de un gen específico significan que el gen respectivo se expresa a partir del genoma, en el que está codificado, más concretamente, en el que está codificado a través de la herencia mendeliana. Sin embargo, alternativamente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula transgénica.

Preferentemente, la expresión génica se prueba al menos en muestras duplicadas, preferentemente al menos en muestras triplicadas. En algunos casos, las células sometidas a ensayo se destruyen, se exponen a condiciones no estériles o se dañan de otro modo como parte del análisis y no pueden utilizarse para el cultivo; no obstante, la información obtenida de estas células destruidas, expuestas o dañadas de otro modo sigue siendo valiosa, en particular cuando las células proceden de una población celular homogénea; puede suponerse razonablemente que la información de este modo obtenida, en particular la información sobre la expresión génica, se aplica no sólo a la célula destruida, expuesta o dañada de otro modo analizada, sino también a otras células de la población de la que procede la célula analizada respectiva. Se puede suponer que se aplica tanto a la población celular como tal, como a cualquier célula individual comprendida en dicha población celular. Homogéneo en este contexto significa que sustancialmente todas las células son muy parecidas o similares.

Una muestra puede consistir en una sola célula, o alternativamente puede contener múltiples células. No hay un límite superior estricto en el número total de células comprendidas en la muestra; sin embargo, el número es típicamente mucho menor que el número total de células comprendidas en una población celular; por ejemplo, es 1/100 o menos, 1/100 o menos, 1/1.000 o menos, 1/10.000 o menos, 1/100.000 o menos, 1/1.000.000 o menos, con respecto a la cantidad de células comprendidas en una población celular.

En términos muy generales, la expresión de un gen puede probarse directamente, tal como típicamente por procedimientos de biología molecular que incluyen la determinación de la presencia y, si es necesario o deseado, los niveles de un producto génico, como ARN mensajero (ARNm) particular o un precursor o producto de degradación del mismo; o, alternativamente, la expresión de un gen puede comprobarse indirectamente, por ejemplo, por medio de procedimientos bioquímicos que incluyen la determinación de la presencia y, si es necesario o se desea, los niveles de una proteína codificada por un gen concreto, tal como una proteína de superficie celular concreta o un precursor o producto de degradación de la misma. Entre las proteínas de superficie adecuadas para la caracterización de la célula, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, se incluyen en particular los clusters de diferenciación (CD).

Cualquier procedimiento conocido para probar la expresión de un gen también puede ser utilizado en la descripción del presente documento. Entre los procedimientos adecuados se incluyen los seleccionados de la lista que comprende, entre otros, el perfil de expresión génica, la reacción en cadena de la polimerasa, como la RCP, tal como la RCP preferentemente cuantitativa (qRCP), incluida la RT-qRCP, la secuenciación de productos de transcripción, cualquier tipo de análisis del transcriptoma, y otros. En cuanto a los ácidos nucleicos, los procedimientos preferentes son las micromatrices y la qRCP.

También se describe que la expresión génica se determina por medio de perfiles de expresión génica. En el campo de la biología molecular, el perfil de expresión génica se relaciona con la medición de la expresión de varios, a menudo miles, de genes, normalmente todos a la vez, para crear una imagen global de la expresión génica celular. Por ejemplo, los perfiles de expresión génica consisten en medir la expresión de varios genes a la vez, normalmente miles pero no necesariamente, para crear una imagen global de una célula. Los perfiles de expresión génica pueden, por ejemplo, distinguir entre las células descritas en la presente memoria descriptiva y otras células. Incluso es posible determinar simultáneamente la expresión de todo un genoma, es decir, de cada gen presente en una célula concreta. Muchos experimentos de este tipo miden simultáneamente todo un genoma, es decir, todos los genes presentes en una célula concreta. Se pueden utilizar varias tecnologías transcriptómicas para generar los datos necesarios para el análisis. En la presente memoria descriptiva son preferentes a veces los micromatrices. Las micromatrices determinan la expresión relativa de los genes, incluidos uno o más genes de interés, como, por ejemplo, APCDD1. Sin querer ceñirse a ninguna

teoría en particular, se entiende que, en la actualidad, los perfiles de expresión génica proporcionan la imagen más global posible de la expresión génica en un solo experimento.

En general, una micromatriz es un procedimiento adecuado para el perfilado de la expresión génica. De hecho, en la presente descripción se utiliza preferentemente una micromatriz para tal fin. Como es comúnmente conocido, una micromatriz muestra si ciertos genes específicos se expresan o no de forma diferente en una célula, en comparación con, por ejemplo, una célula preparada como se describe en la técnica anterior. Las micromatrices están disponibles en el mercado y pueden utilizarse en el contexto de la presente descripción.

También se describe que la expresión génica se determina en un experimento de alto rendimiento. Alternativamente, la expresión génica se determina en un experimento que no es un experimento de alto rendimiento, como por ejemplo un experimento específico dirigido a un gen concreto. También se ha descrito que la expresión génica se determina tanto en un experimento de alto rendimiento como en un experimento que no es de alto rendimiento; en tal caso, el experimento de alto rendimiento suele realizarse en primer lugar, y el experimento que no es de alto rendimiento se realiza posteriormente, por ejemplo, para verificar los resultados del experimento de alto rendimiento. Por ejemplo, una micromatriz (de alto rendimiento) puede ir seguida, por ejemplo con fines de validación o confirmación de la expresión de genes específicos, de una qRCP (no de alto rendimiento).

Las técnicas basadas en secuencias, incluida la secuenciación de alto rendimiento, como la secuenciación de próxima generación (SPG), se pueden utilizar para determinar la expresión génica en la descripción del presente documento. Por ejemplo, la ARN-Sec (secuenciación del ARN), también llamada secuenciación pistola del transcriptoma completo, puede proporcionar información sobre las secuencias de los genes además de su nivel de expresión. ARN-Sec utiliza la secuenciación de próxima generación (SPG) para revelar la presencia y cantidad de ARN en una muestra biológica en un momento dado. También se describe que la expresión génica se determina por medio de una técnica basada en secuencias, como ARN-Sec o RCP y cualquier variación de las mismas.

La expresión de algunos o todos los genes, por ejemplo, de acuerdo con lo revelado por el perfil de expresión génica, tal como en micromatriz, puede entonces verificarse por medio de RT RCP cuantitativa (qRT RCP).

Como es comúnmente conocido, una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRCP, también conocida como reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCP en tiempo real), es un procedimiento de laboratorio basado en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), que es adecuado para determinar la cantidad de un ácido nucleico. En particular, para determinar la cantidad de un transcrito (por ejemplo, ARNm), el procedimiento de elección es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-RCP). En comparación con otros procedimientos de cuantificación del ARN, como el hibridación northern, la qRT-RCP se considera normalmente el ensayo más potente, sensible y cuantitativo para la detección de los niveles de ARN, y por ello es preferente en la descripción de la presente memoria descriptiva. La qRTRCP es también mucho más sensible, para la determinación de la expresión génica, que la determinación indirecta del producto de la expresión génica a nivel proteico, tal como la inmunodetección, por ejemplo por medio de inmunodecoración con anticuerpos primarios o secundarios fluorescentes y la citometría de flujo. por ejemplo. por medio de inmunodecoración con anticuerpos primarios o secundarios fluorescentes y citometría de flujo. La qRT RCP requiere típicamente cebadores específicos para el ácido nucleico respectivo, cuya secuencia está, sin embargo, normalmente disponible a través de bases de datos de secuencias, p. ej. para genes humanos, o puede ser diseñada por el experto basándose en tal información. Existen conjuntos y máquinas comerciales para la qRT-RCP, que pueden utilizarse en la presente descripción. El ácido nucleico que sirve de molde (también denominado "diana") para la determinación de la expresión génica en la qRT RCP es un producto de transcripción, típicamente ARNm.

La qRCP se ejecuta normalmente durante un total de 35 a 45 ciclos consecutivos, más preferentemente 38 a 42 ciclos, y más preferentemente 40 ciclos. Cuando no se observa fluorescencia incluso después de completar el número total de ciclos, entonces se concluye que el ácido nucleico diana está ausente en la muestra analizada.

De manera adecuada, la expresión génica se determina por qRCP (preferentemente qRT-RCP), por medio de la cual se determinan los niveles de expresión de un gen de interés, y preferentemente se comparan con los niveles de expresión de un gen de mantenimiento. Para ello, el gen de mantenimiento preferente es la beta-actina (véase, por ejemplo, la Fig. 8).

Como es habitual en la técnica, los patrones de expresión génica determinados por qRT-RCP se indican por medio de Ct y dCt, respectivamente: En general, en la qRCP, el Ct (umbral de ciclo) se define como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, para que supere el nivel de fondo). En general, el valor Ct es inversamente proporcional a la cantidad del respectivo ácido nucleico (diana) en la muestra (es decir, cuanto menor es el valor Ct, mayor es la cantidad del respectivo ácido nucleico (diana) en la muestra). El Ct es específico de la expresión de un gen. Delta Ct (dCt) indica la diferencia de expresión entre 2 genes, normalmente entre un gen de interés y un gen de mantenimiento, como beta-actina (véase por ejemplo la Fig. 8).

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa al menos un gen específico de las células estromales mesenquimales.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza, entre otras cosas, porque expresa APCDD1. En particular, la célula expresa APCDD1. Los inventores descubrieron que los genes específicos de las células estromales mesenquimales descritas en la presente memoria descriptiva están incluidos en la lista que comprende, entre otros, APCDD1 y PPARG, y opcionalmente FLVCR2. Más preferentemente, dicho al menos un gen específico de las células estromales se expresa a niveles elevados, en comparación con el gen de mantenimiento beta-actina, en relación con la relación de expresión de dicho al menos un gen frente a beta-actina en las células de referencia. Un ejemplo de este fenotipo se muestra en el Ejemplo 8.

Mientras que la literatura anterior ha sido incierta sobre si las CEMs no perivasculares son o no distintas de las CEMs perivasculares (por ejemplo, Davies et al., Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol. 6, p. 1620-1630), la descripción del presente documento proporciona pruebas (por ejemplo, el Ejemplo 8) de que las células estromales derivadas de Jalea de Wharton obtenidas de acuerdo con la presente invención son distintas de las CEMs perivasculares.

También se ha descrito que la expresión génica se determina indirectamente, es decir, no por medio de la determinación del producto de transcripción primario, el ARNm o su precursor o su producto de degradación, sino por medio de la determinación de un producto específico situado más abajo. Típicamente, el producto específico posterior es una proteína codificada por el ARNm; sin embargo, también puede ser cualquier otro producto específico, tal como por ejemplo un metabolito que es específico de la presencia de una proteína particular, por ejemplo enzimáticamente activa.

Preferentemente, se determina la presencia de una proteína. Más preferentemente, se determina la presencia de una proteína en la superficie celular. En otras palabras, se determina si una proteína se muestra en la superficie celular.

Las células que muestran una proteína particular en la superficie celular pueden analizarse, por ejemplo, por medio de moléculas inmunológicamente activas, como anticuerpos específicos y otras moléculas inmunorreactivas. La "superficie celular" se utiliza en la presente memoria descriptiva de acuerdo con su significado habitual en la técnica y, por lo tanto, incluye específicamente el exterior de la célula que es accesible a la unión de proteínas y otras moléculas. Una proteína se visualiza en la superficie de la célula si está localizada, al menos parcialmente, en la superficie de dicha célula y es accesible a la unión por moléculas de unión a antígenos, tal como los anticuerpos antígeno-específicos añadidos a la célula. También se ha descrito que una proteína que se muestra en la superficie de la célula es una proteína integral de membrana que tiene una porción extracelular que puede ser reconocida por un anticuerpo. El término "porción extracelular" o "exodominio" en el contexto de la presente descripción significa una parte de una molécula, en particular una proteína, que está orientada hacia el espacio extracelular de una célula y preferentemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por medio de moléculas de unión como anticuerpos situados fuera de la célula. Preferentemente, el término se relaciona con uno o más bucles o dominios extracelulares o a un fragmento de los mismos. El término "porción" se utiliza en la presente memoria descriptiva y se relaciona con un elemento continuo o discontinuo de una estructura, como una secuencia de aminoácidos. Una porción o parte de una secuencia proteica comprende preferentemente al menos 5, en particular al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos y/o no consecutivos de la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína.

Una proteína detectable por un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva también puede denominarse antígeno. En ocasiones, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede caracterizarse por mostrar -o no mostrar- uno o más antígenos específicos. En el contexto de la presente descripción, tal antígeno se muestra preferentemente en la superficie de la célula. Tal antígeno también puede denominarse "antígeno de superficie". En el ejemplo 7 se dan ejemplos de ello.

De acuerdo con los principios generales de la biología celular, cuando un antígeno se muestra en la superficie de la célula, entonces el gen que codifica el antígeno es expresado por la célula. Por lo tanto, la detección de un antígeno que se muestra en la superficie de la célula es un medio indirecto para demostrar que el gen que codifica el antígeno se expresa. Por ejemplo, cuando en la presente memoria descriptiva se dice que la célula expresa un determinado gen, que codifica un antígeno expresado en la superficie de la célula, entonces la expresión de dicho gen puede probarse directamente a nivel del producto de expresión del gen (como el ARNm), o indirectamente a nivel de la proteína mostrada en la superficie de la célula. Aunque la palabra "expresar", en sentido estricto significa que un gen se expresa, la palabra "expresar" también puede significar describir que una proteína, en particular una proteína de la superficie celular, que está codificada por dicho gen, se muestra en la célula.

También descrito, un antígeno se muestra en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto para permitir la unión por anticuerpos específicos de antígeno añadidos a la célula. También descrito, se dice que un antígeno no se expresa en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos del antígeno añadidos a la célula. Preferentemente, un antígeno expresado en una célula se expresa o expone, es decir, está presente, en la superficie de dicha célula y, por tanto, disponible para su unión por moléculas antígeno-específicas como anticuerpos u otra molécula inmunorreactiva añadida a la célula. En algunos casos, también se añade una molécula secundaria que ayuda a la detección, tal como por ejemplo un anticuerpo secundario opcionalmente marcado.

Un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva puede reconocer un epítipo en la célula. El término "epítipo" se relaciona con un determinante antigénico en una molécula como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula que es reconocido, es decir, unido, por el sistema inmunitario, por ejemplo, que es reconocido por un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva. La detección de un epítipo específico para cualquier antígeno concreto permite normalmente concluir que ese antígeno concreto se expresa en la célula analizada.

También descrita, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva puede ser caracterizada por inmunofenotipado. "Inmunofenotipado" significa generalmente que la célula puede caracterizarse por medio de moléculas específicas de antígeno, tales como anticuerpos u otras moléculas inmunorreactivas, que se añaden a la célula para determinar si un antígeno se expresa en una célula. El inmunofenotipado incluye la clasificación celular por medio de diversos procedimientos, incluida la citometría de flujo.

Un procedimiento preferente para el inmunofenotipado es la citometría de flujo, en particular CCAF. Se reconoce un analito, en particular una proteína de la superficie celular, normalmente con un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva. El propio anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva está marcado con fluoróforos o es reconocido por un anticuerpo secundario marcado con fluoróforos u otra molécula inmunorreactiva, que se añade a tal efecto.

Analitos preferentes adecuados para inmunofenotipado en el contexto de la presente descripción son moléculas que pertenecen al clúster de diferenciación (también conocido como clúster de designación o determinante de clasificación y abreviado en la presente memoria descriptiva como CD). La CD es un término utilizado para la identificación e investigación de moléculas de la superficie celular por medio del inmunofenotipado de células. A continuación se describen algunos ejemplos de grupos de diferenciación adecuados para caracterizar las versiones de la célula descritas en la presente memoria descriptiva. A menos que el contexto indique lo contrario, cuando se hace referencia a la expresión de cualquier molécula del Clúster de Diferenciación (CD), se entiende que la expresión de la molécula CD respectiva se determina preferentemente por medio de inmunofenotipado; sin embargo, también es posible la determinación a nivel de ácido nucleico. En la presente memoria descriptiva, la referencia a una molécula CD específica, con referencia a células humanas, significa la molécula CD específica respectiva de acuerdo con las definiciones asignadas por los Talleres I-IX de Antígenos de Diferenciación Leucocitaria Humana. El ejemplo 7 proporciona una descripción ejemplar y útil del inmunofenotipado descrito en la presente memoria descriptiva.

Por otra parte, a menos que el contexto dicte lo contrario, cuando en la presente divulgación se hace referencia a la expresión de cualquier gen que no sea una molécula de Clúster de Diferenciación (CD) o ácido nucleico que codifique la misma, se pretende que la expresión del gen respectivo se determine preferentemente a nivel de ácido nucleico, preferentemente por medio de un procedimiento mencionado o descrito anteriormente.

En primer lugar, la CEM descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza porque (a) expresa APCDD1. La expresión de APCDD1 se detecta preferentemente a nivel de expresión génica, más preferentemente por medio de qRT RCP. En la Fig. 8 se muestra un ejemplo.

Sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que APCDD1 es importante para la capacidad de autorrenovación de la célula: se demostró anteriormente que el producto génico mantiene niveles elevados de beta-catenina, y la beta-catenina mantiene el carácter troncal de las células, en particular de las CEM (Viale-Bouroncle et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015 vol. 457, p. 314-317; Yu, Cell Transplant., 2017, vol. 26, p. 365-377). Como se muestra en el Ejemplo 8, las células descritas en la presente memoria descriptiva se distinguen de las células derivadas de PVJW, *entre otras cosas*, por la expresión de APCDD1. De este modo pues, la célula que expresa APCDD1 descrita en la presente memoria descriptiva es claramente diferente de las CEM descritas en el estado de la técnica, véase en particular los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, págs. 220-229.

Sin embargo, el CEM descrito en la presente memoria descriptiva no expresa 3G5. 3G5 es un marcador de células perivasculares. Por lo tanto, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula perivascular. Por lo tanto, preferentemente, la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva no expresa ningún marcador de una célula perivascular que no sea al mismo tiempo también un marcador de una célula mesenquimal y/o una célula madre.

Preferentemente, la célula expresa al menos un gen específico para células estromales, más particularmente para células estromales mesenquimales. Preferentemente, la célula muestra en su superficie al menos un marcador de superficie específico para células estromales, más particularmente para células estromales mesenquimales.

También descrito, el al menos un marcador de superficie específico para células estromales, más particularmente para células estromales mesenquimales, se selecciona de la lista que comprende pero no se limita a la proteína cofactor de membrana (CD46), factor acelerador de desintegración o CD55, y proteína inhibidora de MAC (CD59). Anteriormente se había descrito que los tres marcadores estaban relacionados con la cascada del complemento. Como se muestra en la Fig. 7B, las células ejemplificadas en la presente descripción muestran estos marcadores en su superficie. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que uno o más de estos marcadores de superficie desempeñan un papel en la protección de las células frente a la lisis celular mediada por el complemento *in vivo*. Preferentemente, la célula expresa al menos uno de los CD46, CD55 y CD59, más preferentemente al menos

dos de los CD46, CD55 y CD59, y más preferentemente todos los CD46, CD55 y CD59. Por lo que saben los inventores, CD46, CD55 y CD59 no se han descrito previamente en CEMs específicas derivadas de CU, aunque, por supuesto, no puede excluirse que algunas células expresen realmente una o más de estas moléculas de superficie.

5 Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa CD73. CD73 también se conoce como ecto 5' nucleotidasa y es un marcador de células estromales mesenquimales (CEM), véase Dominici et al., 2006 (Cytotherapy, vol. 8, p. 315-317).

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa CD105. CD105 (también conocido como endoglin) es otro marcador de las células estromales mesenquimales (CEM), véase Dominici et al., 2006 (Cytotherapy, vol. 8, p. 315-317).

10 Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa CD90. CD90 (también conocido como Thy-1) es otro marcador de las células estromales mesenquimales (CEM), véase Dominici et al., 2006 (Cytotherapy, vol. 8, p. 315-317).

15 En una descripción muy preferente, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva expresa tanto CD105 como CD73. Además de los procedimientos generales descritos anteriormente, estos grupos de diferenciación pueden detectarse, por ejemplo, por medio de los anticuerpos SH2 y SH3(Horwitz et al., Curr. Opin. Hematol., 2006, vol. 13, p. 419-425). Normalmente, una célula estromal mesenquimal como la descrita en la presente memoria descriptiva expresa tanto CD105 como CD73, y preferentemente también CD90. De este modo, la expresión de CD105 y/o CD73 y/o CD73 puede ser adecuada para distinguir la célula descrita en la presente memoria descriptiva de algunas otras células. Más preferentemente, la célula expresa, además de uno o más de CD105 y/o CD73 y/o CD73, también al menos uno de CD46, CD55 y CD59, más preferentemente al menos dos de CD46, CD55 y CD59, y más preferentemente todos los CD46, CD55 y CD59.

20 En una descripción preferente, la célula expresa además PPARG. En la Fig. 8 se muestra un ejemplo. Sin querer atarse a ninguna teoría en particular, se cree que el producto del gen PPARG es capaz de mantener las células, en particular las CEM, en un fenotipo multipotente, en particular para evitar la diferenciación en tejido óseo. Para más detalles, véase, por ejemplo, Xu et al. (Curr. Stem Cell Res. Ther., 2016, vol. 11, p. 247-254).

25 En otra descripción preferente y no mutuamente excluyente, la célula expresa además el gen FLVCR2. En la Fig. 8 se muestra un ejemplo. La abreviatura FLVCR2 significa familia de receptores celulares del subgrupo C del virus de la leucemia felina, miembro 2. La proteína FLVCR2 codificada es una proteína transmembrana miembro de la superfamilia de los grandes facilitadores que funciona como transportador de calcio. En los seres vivos, se ha descrito anteriormente que la proteína codificada podría desempeñar un papel en el desarrollo de las células endoteliales vasculares cerebrales.

30 En una descripción preferente, la célula no expresa CD117. CD117 es un marcador de superficie celular específico de ciertos tipos de progenitores hematopoyéticos (de la sangre), tales como los de la médula ósea. La célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula sanguínea y, preferentemente, tampoco es una célula de la médula ósea. CD117 también se ha asociado con algunos tipos de cáncer; sin embargo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es normalmente una célula cancerosa. En otras palabras, en la presente memoria descriptiva no se hace referencia a las células oncogénicas como células descritas en la presente memoria descriptiva.

35 La célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa preferentemente el CMH I. En el caso de una célula mesenquimal estromal humana, es preferente que la célula humana exprese al menos uno, preferentemente al menos cualquier combinación de dos, y más preferentemente todos los antígenos leucocitarios humanos ALH-A, ALH-B y ALH-C.

40 A veces, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no expresa MHC II, o expresa MHC II a niveles bajos. "niveles bajos" es una expresión relativa que indica que los niveles de expresión son inferiores a los de las células presentadoras de antígenos del mismo individuo, por ejemplo, células dendríticas, fagocitos mononucleares y linfocitos B del mismo individuo. También se ha descrito que la célula no expresa sustancialmente MHC II. En particular, en el caso de una célula estromal mesenquimal humana, es preferente que la célula no exprese uno o más de los antígenos leucocitarios humanos ALH-DP, y/o ALH-DQ. Opcionalmente tampoco se expresa ALH-DR; alternativamente, ALH-DR se expresa a niveles bajos. La ausencia de expresión de estos antígenos leucocitarios humanos (ALH), o la expresión a niveles bajos, hace que la célula descrita en la presente memoria descriptiva sea inmunoprivilegiada, lo que permite, por ejemplo, el co-cultivo con células de individuos con ALH incompatible, e incluso células de otras especies, incluidas las células del sistema inmunitario. La expresión de estos antígenos leucocitarios humanos puede comprobarse, por ejemplo, por medio de tinción de superficie con anticuerpos específicos, o por medio de qRT RCP.

También se describe que la célula descrita en la presente memoria descriptiva es negativa para los marcadores de superficie CD34 y/o CD45. Esto significa que la célula no muestra CD34 y/o CD45.

55 También se ha descrito que la célula descrita en la presente memoria descriptiva produce prostaglandina E2 (PGE2). Como es bien sabido, la prostaglandina E2 (PGE2), también conocida como dinoprostona, es una prostaglandina natural que se ha descrito como un activador de la vía de señalización Wnt(Goessling et al., Cell, 2009, vol. 136, p.

1136-1147). Existen varios productos comerciales, en particular conjuntos ELISA, para la determinación de la producción de PGE2. La detección puede realizarse utilizando como muestra sobrenadante celular o lisado celular, o una combinación de ambos.

5 También se describe que la célula descrita en la presente memoria descriptiva expresa uno o más marcadores de células madre. Dichos marcadores de células madre pueden incluir típicamente marcadores seleccionados entre Oct-4 y Nanog, pero sin limitarse a ellos.

Tamaño de la célula

10 Además de las otras características y descripciones descritas en la presente memoria descriptiva, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza preferentemente también por un tamaño relativamente pequeño. El tamaño puede describirse, por ejemplo, por medio de el volumen celular, el diámetro celular o la superficie celular, o por medio de un parámetro correlacionado con el volumen celular, el diámetro celular o la superficie celular. El tamaño también puede describirse por medio de una combinación de cualquiera de los anteriores. "Relativamente" significa en comparación con otras células, en particular en comparación con células estromales mesenquimales de otras fuentes y/u otras aisladas por otros procedimientos. "Otras fuentes" significa otras zonas anatómicas, tal como, por
15 ejemplo, otros órganos, como la médula ósea, pero también otras secciones del cordón umbilical, como la zona perivascular, y de cualquier Jalea de Wharton perivascular.

20 Sin querer estar limitado por ninguna teoría en particular, se cree que, a veces, las células más pequeñas (por ejemplo, células con un diámetro más pequeño y/o células con una superficie más pequeña) se encuentran más temprano en el ciclo celular. Se han publicado procedimientos para determinar el estado del ciclo celular de las CEM (por ejemplo, Achille et al., J. Cell. Biochem., 2011, vol. 112, p. 1817-1821) y puede aplicarse a las células como se describe en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, con fines analíticos.

25 El valor de luz dispersada hacia adelante (LDHA) determinado para una célula individual por citometría de flujo se correlaciona con el volumen celular. Las células más grandes, es decir, sobre todo las que tienen un mayor volumen celular, se caracterizan por valores de LDHA más elevados, y *viceversa*. Como es sabido de forma general, el valor LDHA es un número adimensional. Para determinar el LDHA, se analizan una o más células por medio de citometría de flujo. En general, los valores de LDHA, determinados por citometría de flujo, dependen del instrumento utilizado, en particular de las características del láser y de la potencia de los fotomultiplicadores de máquina a máquina. Por consiguiente, no existe un valor LDHA absoluto, el valor suele depender de la máquina y el láser utilizados. Por lo tanto, para garantizar la reproducibilidad, los siguientes detalles, en combinación, son preferentes en el contexto de la
30 presente descripción.

35 Cuando el valor LDHA se determina por citometría de flujo, la longitud de onda de excitación está preferentemente en el intervalo de 470 a 500 nm, más preferentemente 488 nm, y se determina la luz dispersada hacia adelante (LDHA). No es necesario que la propia célula sea fluorescente para determinar el LDHA. Para dicha determinación por citometría de flujo, se suele utilizar un aparato comercial de citometría de flujo. En una descripción preferente, se utiliza el citómetro de flujo FACSAria III (BD Biosciences), con una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los valores numéricos específicos del LDHA especificados a continuación se refieren todos preferentemente a dichas condiciones, es decir, dicho citómetro y dicha longitud de onda. Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por un valor LDHA de 60 o menos, tal como 59 o menos, tal como 58 o menos, tal como 57 o menos, tal como 56 o menos, tal como 55 o menos, tal como 54 o menos, tal como 53 o menos, tal como 52 o
40 menos, tal como 51 o menos, o incluso 50 o menos. A veces, la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva se caracteriza por un valor LDHA de 32 a 58, tal como 33 a 57, tal como 34 a 56, tal como 35 a 55, tal como 36 a 54, tal como 37 a 53, tal como 38 a 52, tal como 39 a 51, tal como 40 a 50, tal como 41 a 49, tal como 42 a 48, tal como 43 a 47, tal como 44 a 46. En una descripción preferente, el valor LDHA es de aproximadamente 45. Estos valores numéricos específicos de LDHA se relacionan con la determinación por medio del citómetro de flujo FACSAria III en las condiciones descritas anteriormente.
45

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por un valor LDHA menor que el valor LDHA de una célula derivada de PVJW. Preferentemente, el valor LDHA de la célula descrita en la presente memoria descriptiva es significativamente menor que el valor LDHA de una célula derivada de PVJW, véase, por ejemplo, el Ejemplo 4.

50 Preferentemente, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva tiene un volumen de célula más pequeño que el volumen de una célula derivada de PVJW. Más Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva tiene un volumen celular significativamente menor que el volumen de una célula derivada de PVJW. El volumen celular puede determinarse indirectamente por medio de la determinación del valor LDHA por citometría de flujo (para más detalles sobre la determinación del valor LDHA, véase más arriba). A continuación, con fines comparativos, una perla de tamaño conocido se somete opcionalmente a citometría de flujo en condiciones idénticas; de este modo se puede determinar el volumen de una célula basándose en el valor LDHA determinado experimentalmente para la célula y el valor LDHA determinado experimentalmente para la perla, y el volumen conocido de la perla. La perla utilizada tiene preferentemente un índice de refracción similar o esencialmente idéntico al índice de refracción del CEM. Existen programas informáticos comerciales para calcular el volumen celular a partir del LDHA
55

determinado experimentalmente. Los instrumentos preferentes para determinar el volumen celular son CCAF ARIA III y CCAF DIVA (ambos de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). El análisis de datos se realiza con el software CCAF DIVA versión 6.0 que normalmente está asociado al CCAF ARIA III. Se utiliza la configuración estándar de CCAF DIVA. Para comparar múltiples muestras, o células, basándose en los valores LDHA, es necesario trabajar siempre en el mismo instrumento y siempre con los mismos ajustes para los fotomultiplicadores LDHA.

El LDHA y por lo tanto el volumen celular puede determinarse tanto para células recién aisladas como para células cultivadas y separadas enzimáticamente - por ejemplo tripsinizadas. Sin embargo, el LDHA y el volumen celular se determinan preferentemente para células no adherentes. Para la citometría de flujo, toda célula adherida debe desprenderse de la superficie del recipiente de cultivo a la que se adhiere, antes de la determinación del volumen celular, normalmente por medio de tratamiento enzimático, más particularmente por tripsinización. Más concretamente, el LDHA se determina típicamente sometiendo células no adherentes a citometría de flujo y determinando la luz dispersa hacia delante (LDHA). Existen programas informáticos comerciales para determinar el volumen celular a partir del LDHA determinado experimentalmente. Un software comercial preferente para la determinación del volumen celular de acuerdo con la presente descripción es el software BD FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

Aunque los inventores han demostrado que las células descritas en la presente memoria descriptiva son relativamente homogéneas, típicamente hay alguna variación, como con todos los productos biológicos, también con respecto al volumen celular. Por lo tanto, el volumen celular también puede describirse como el volumen celular medio. En una población de células múltiples, el volumen celular medio es preferentemente un volumen celular que corresponde al volumen celular de las células obtenidas como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2A, para la determinación experimental del LDHA. El ejemplo 4 describe por medio de un ejemplo cómo se determina el LDHA de una multitud de células por medio de citometría de flujo y dispersión hacia delante. El "volumen medio" representa la media aritmética del volumen de las células individuales, determinado experimentalmente. Típicamente, el "volumen medio" representa la media aritmética de los volúmenes de al menos 1.000 eventos individuales, tal como al menos 5.000 eventos individuales, tal como al menos 10.000 eventos individuales, a veces de 100 a 1.000.00000 eventos individuales. Cada evento determinado por citometría de flujo corresponde normalmente a una célula. Dado que la determinación del volumen celular por citometría de flujo es un procedimiento de alto rendimiento, la media de tales números de células individuales puede determinarse normalmente sin un tiempo y un esfuerzo desmesurados.

También descrito, el volumen celular no se determina en sí mismo, sino que se determina el valor LDHA. Normalmente, cuando una célula dada tiene un valor LDHA inferior al valor LDHA de una célula de referencia, entonces la célula dada también tendrá un volumen celular inferior al de la célula de referencia; por lo tanto, la determinación del LDHA permite llegar a una conclusión indirecta sobre el volumen de una célula.

Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva tiene una superficie no superior a $3.500 \mu\text{m}^2$. Preferentemente, la célula tiene una superficie no superior a $3.000 \mu\text{m}^2$. Preferentemente, la célula tiene una superficie no superior a $2.500 \mu\text{m}^2$. Preferentemente, la célula tiene una superficie no superior a $2.100 \mu\text{m}^2$. A veces, la célula tiene una superficie no superior a $2.000 \mu\text{m}^2$. "superficie" se relaciona con la superficie bidimensional de una célula.

En el contexto de la presente divulgación, el área superficial bidimensional de una célula se determina mientras la célula está en cultivo adherente, es decir, la célula se adhiere a la placa de cultivo. Es importante que las células se encuentren en un estado de baja confluencia. La subconfluencia se considera ventajosa para la reproducibilidad de la determinación porque se cree que las células subconfluentes sustancialmente no se inhiben entre sí por inhibición de contacto. Para determinar la superficie, se fotografían una o más células o se observan o registran visualmente de otro modo, normalmente con un microscopio, desde la dimensión perpendicular (es decir, 90°) a la superficie de la placa de cultivo a la que se adhieren la célula o células. Los límites de la zona suelen definirse manualmente en una imagen gráfica (es decir, una fotografía) de la celda. Es preferente evitar o reducir al mínimo la agitación de las placas antes de tomar la imagen gráfica. Los procedimientos y programas informáticos para determinar la superficie no están especialmente limitados, y los programas correspondientes están disponibles en varios proveedores comerciales, por ejemplo, Carl Zeiss (Jena, Alemania). Para la determinación de la Fig. 6 se utilizó Axiovision LE 4.8 de Carl Zeiss (Jena, Alemania). A modo de ejemplo, los procedimientos para determinar la superficie de las células cultivadas en una placa de cultivo se describen en Agle et al., 2012, J. Histochem. Cytochem, vol. 60, p. 428-438, entre otros.

Aunque los inventores han demostrado que las células descritas en la presente memoria descriptiva son relativamente homogéneas, típicamente hay alguna variación, como con todos los productos biológicos, también con respecto al área de superficie celular. Por lo tanto, la superficie celular también puede describirse como la superficie celular media. En tal caso, es preferente que la célula tenga una superficie media no superior a $3000 \mu\text{m}^2$. Preferentemente, la célula tiene una superficie media no superior a $2500 \mu\text{m}^2$. Preferentemente, la célula tiene una superficie media no superior a $2100 \mu\text{m}^2$. A veces, la célula tiene una superficie no superior a $2000 \mu\text{m}^2$. En una población de células múltiples, la superficie media se encuentra preferentemente dentro de las limitaciones en la presente memoria descriptiva indicadas. El "área media" representa la media aritmética de las áreas de las células individuales, determinadas experimentalmente. Típicamente, el "área media" representa la media aritmética de las áreas de al menos 35 células individuales, tales como al menos 50 células individuales, tales como al menos 100 células individuales, en algunas descripciones de 35 a 200 células individuales.

Como se muestra en la Fig. 6, la célula descrita en la presente memoria descriptiva tiene preferentemente un área de superficie significativamente menor que las CEM derivadas de médula ósea. A veces, la célula descrita en la presente memoria descriptiva también tiene una superficie menor que la superficie de las células mesenquimales estromales derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW), como las descritas en los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229. Las células mesenquimales derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW) también pueden denominarse "células mesenquimales derivadas de la zona perivascular".

Preferentemente, el volumen medio y/o el área superficial de las células descritas en la presente memoria descriptiva es menor que el volumen medio y/o el área superficial de las CEM derivadas de médula ósea (Fig. 6) y menor que las CEM derivadas de cordón umbilical del área perivascular (Fig. 5B). En la bibliografía, el menor volumen celular de las CEMs se ha considerado ventajoso por diversas razones (véase, por ejemplo, Ge et al., Stem Cell Rev., 2014, vol. 10, p. 295-303). Gracias a lo descrito en la presente memoria descriptiva, ahora se puede disponer de forma fiable de células con propiedades tan ventajosas.

Preferentemente, la complejidad interna de la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es menor que la complejidad interna de una CEM derivada de PVJW. La complejidad interna suele determinarse por medio del análisis de dispersión lateral (CSE). En general, las células con una estructura interna más compleja aparecen más brillantes/brillantes en el análisis de dispersión lateral, debido a las estructuras internas, véase, por ejemplo, el Ejemplo 4A. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, una baja complejidad interna puede estar asociada al tallo. Para comparar varias muestras basándose en los valores CSE, es necesario trabajar siempre con el mismo instrumento y siempre con los mismos ajustes para los fotomultiplicadores LDHA y CSE, ya que los valores CSE, al igual que los valores CSE, determinados por citometría de flujo, dependen del instrumento utilizado, en particular de las características del láser y de la potencia de los fotomultiplicadores de máquina a máquina. En la presente descripción, la máquina de citometría de flujo, el láser y los ajustes y el software utilizados para la determinación de los valores CSE son preferentemente los mismos que los descritos anteriormente para la determinación de los valores LDHA.

También se describe que las células derivadas de JWE como se describe en la presente memoria descriptiva se caracterizan por una menor complejidad interna (mostrada por CSE) que las células derivadas de PVJW.

Preferentemente, dichas células derivadas de JWE se caracterizan tanto por un menor volumen celular (mostrado por LDHA) como por una menor complejidad interna (mostrada por CSE), que las células derivadas de PVJW. Las células derivadas de PVJW pueden obtenerse, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos Comparativos de la presente divulgación.

Propiedades biológicas celulares: Potencial de diferenciación, senescencia e inmortalidad

En general, el potencial de diferenciación, la senescencia y la inmortalidad pueden denominarse conjuntamente "propiedades biológicas celulares". Huelga decir que la célula descrita en la presente memoria descriptiva tiene propiedades biológicas celulares adicionales, que pueden ser analizadas experimentalmente por el experto en la materia. El término "propiedades biológicas celulares", tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, es por tanto un término abierto que también incluye propiedades adicionales de una célula que pueden determinarse por medio de un ensayo biológico, incluso si dichas propiedades adicionales no se especifican explícitamente en la presente memoria descriptiva.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula mesenquimal, particularmente una célula estromal mesenquimal (CEM). Dicha CEM es normalmente clonogénica, a menos que el contexto dicte lo contrario. Por lo tanto, incluso una sola célula, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, es una unidad formadora de colonias (UFC) que puede dar lugar a una multitud de células hijas.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva también puede denominarse "célula progenitora estromal". En general, una célula progenitora estromal suele ser capaz de dar lugar a hijas fenotípica y genotípicamente idénticas (autorenovación), así como al menos a otro tipo celular final. También se describe que la célula, tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, no está comprometida con el linaje.

De este modo, preferentemente, la célula no está diferenciada terminalmente. También se describe que la célula no está más diferenciada, más allá de ser una célula mesenquimal. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en varios tipos celulares. A veces, la diferenciación en uno o varios de estos tipos celulares es inducible, por ejemplo, por medio de estímulos externos y/o condiciones de cultivo específicas.

Preferentemente, la célula es al menos multipotente. La multipotencia puede probarse demostrando que una célula es capaz de diferenciarse en múltiples tipos celulares diferentes, al menos dos. No existen limitaciones particulares en cuanto al ensayo adecuado para realizar dicha demostración. Sin embargo, normalmente la demostración se realiza *in vitro*. De este modo, preferentemente, la CEM descrita en la presente memoria descriptiva es una célula con capacidad de diferenciación multipotente *in vitro*. En los ejemplos 12, 13 y 14 se dan ejemplos de distintos tipos de diferenciación. Por ejemplo, el potencial de diferenciación osteogénica puede determinarse como se describe en el Ejemplo 12, aunque alternativamente pueden utilizarse procedimientos establecidos. El ensayo para el potencial de diferenciación osteogénica descrito en el Ejemplo 12 se desarrolló específicamente en el contexto de la presente descripción. En

comparación con los ensayos más avanzados de potencial osteogénico, muchos de los cuales se han desarrollado con CEMs derivadas de médula ósea, el ensayo del Ejemplo 12 permite una expansión relativamente lenta de las células; esto, a su vez, permite que las células (derivadas del cordón umbilical) se adhieran al recipiente de cultivo, lo que normalmente es un requisito previo para un ensayo osteogénico.

- 5 Por ejemplo, el potencial de diferenciación adipogénica puede determinarse como se describe en el Ejemplo 13, aunque también pueden utilizarse otros procedimientos establecidos. Por ejemplo, el potencial de diferenciación condrogénica puede determinarse como se describe en el Ejemplo 14, aunque también pueden utilizarse otros procedimientos establecidos. "potencial de diferenciación" significa que una célula determinada es capaz de diferenciarse en una célula de un determinado linaje.
- 10 Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula de linaje osteogénico. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula del linaje condrogénico. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula de linaje adipogénico. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula del linaje osteogénico y en una célula del linaje condrogénico. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula del linaje osteogénico y en una célula del linaje adipogénico. Preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula del linaje osteogénico y en una célula del linaje adipogénico. Más preferentemente, la célula es capaz de diferenciarse en una célula del linaje osteogénico y en una célula del linaje condrogénico y en una célula del linaje adipogénico. Cuando una célula es capaz de diferenciarse en una célula de un determinado linaje, se quiere decir que la célula se diferenciará en consecuencia, a condición de que se someta a las condiciones adecuadas. Por ejemplo, las condiciones particularmente adecuadas para la diferenciación en una célula del linaje osteogénico se proporcionan en el Ejemplo 12. Alternativamente, puede utilizarse un conjunto comercial adecuado para la diferenciación de una célula estromal mesenquimal en una célula del linaje osteogénico, a condición de que el conjunto permita la adherencia de la célula al recipiente de cultivo, para comprobar si una célula determinada (célula estromal mesenquimal) es capaz de diferenciarse en una célula del linaje osteogénico; un conjunto descrito para dicho ensayo es el diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales hMSC BulletKit™ conjunto de Lonza (Wakersville, MD, EE.UU.). Por ejemplo, las condiciones apropiadas para la diferenciación en una célula del linaje condrogénico se proporcionan en el Ejemplo 13. Alternativamente, puede utilizarse un conjunto comercial adecuado para la diferenciación de una célula estromal mesenquimal en una célula del linaje condrogénico para comprobar si una célula determinada (célula estromal mesenquimal) es capaz de diferenciarse en una célula del linaje condrogénico; un conjunto adecuado es el conjunto de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales hMSC BulletKit™ de Lonza (Wakersville, MD, EE.UU.). Por ejemplo, las condiciones apropiadas para la diferenciación en una célula del linaje condrogénico se proporcionan en el Ejemplo 14. Alternativamente, puede utilizarse un conjunto comercial adecuado para la diferenciación de una célula estromal mesenquimal en una célula del linaje condrogénico para comprobar si una célula determinada (célula estromal mesenquimal) es capaz de diferenciarse en una célula del linaje condrogénico; un conjunto adecuado es el conjunto de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales hMSC BulletKit™ de Lonza. Por ejemplo, las condiciones apropiadas para la diferenciación en una célula del linaje adipogénico se proporcionan en el Ejemplo 13. Alternativamente, puede utilizarse un conjunto comercial adecuado para la diferenciación de una célula estromal mesenquimal en una célula del linaje adipogénico para comprobar si una célula determinada (célula estromal mesenquimal) es capaz de diferenciarse en una célula del linaje adipogénico; un conjunto adecuado es el conjunto de diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales hMSC BulletKit™ de Lonza.

Opcionalmente, la célula es incluso pluripotente, sin embargo no es totipotente. El potencial de diferenciación puede determinarse sometiendo una célula a condiciones específicas. La transdiferenciación se ha descrito en la técnica y, por lo tanto, se puede comprobar si una célula determinada, como una CEM, es capaz de diferenciarse en una célula ectodérmica o endodérmica específica.

- 45 Opcionalmente, la célula tiene otros potenciales de diferenciación. Dichos potenciales de diferenciación adicionales se seleccionan entre los potenciales de diferenciación típicos de las células estromales mesenquimales. Sin embargo, como es típico de las células estromales mesenquimales, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no suele ser totipotente.

50 Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva es una célula madre mesenquimal. De este modo, en esa descripción, la célula estromal mesenquimal es una célula madre mesenquimal. En otras palabras, es preferente que la célula tenga propiedades similares a las de las células madre. Las propiedades similares a las células madre y sus marcadores se describen, por ejemplo, por Melton, en el capítulo 2 de Lanza y Atala (eds.), *Essentials of Stem Cell, Biology*, 3ª ed., Elsevier, 2014.

55 Preferentemente, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva no muestra niveles anormalmente altos de actividad telomerasa. "actividad telomerasa" se relaciona con la actividad enzimática de la enzima telomerasa. Como es sabido, la telomerasa es una enzima que alarga los telómeros de las cadenas de ADN, lo que permite a las células senescentes, que de otro modo se convertirían en postmitóticas y sufrirían apoptosis, superar el límite de Hayflick y, en algunos casos, convertirse en inmortales. Alternativamente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva muestra actividad telomerasa, sin embargo, a niveles bajos. La actividad telomerasa suele determinarse por medio de la determinación de la actividad enzimática; más concretamente, suele determinarse por medio de la determinación de la actividad enzimática de la transcriptasa inversa telomerasa (abreviada TITE, o hTITE en

humanos), que es una subunidad catalítica de la enzima telomerasa. En el ejemplo 10 se ofrece un ejemplo de ello. La actividad de la telomerasa puede determinarse por medio del conjunto TeloTAGGG Telomerasa RCP ELISA PLUS (Roche Diagnostics), un inmunoensayo enzimático fotométrico para la determinación cuantitativa de la actividad de la telomerasa. A título ilustrativo, véase, por ejemplo, el Ejemplo 10. Se dice que la actividad telomerasa es baja, si el conjunto se utiliza de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las células analizadas muestran un 10 % o menos, tal como preferentemente un 5 % o menos, de actividad telomerasa con respecto al control positivo proporcionado en dicho conjunto TeloTAGGG Telomerasa RCP ELISA PLUS (considerado como el 100 %). El porcentaje, es decir, 10 % o menos, tal como preferentemente 5 % o menos, se relaciona con la media de las células, es decir, significa que las células analizadas muestran una media de 10 % o menos, tal como preferentemente 5 % o menos, de actividad telomerasa con respecto a dicho control. Existen en el mercado varios reactivos y conjuntos alternativos para detectar la actividad de la telomerasa, que pueden utilizarse alternativamente en el contexto descrito en la presente memoria descriptiva.

Alternativamente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no expresa ninguna telomerasa. En otras palabras, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no muestra ninguna actividad telomerasa. Más concretamente, una célula de este tipo se caracteriza por la ausencia de expresión detectable de telomerasa. La expresión génica puede detectarse directamente o indirectamente por medio de la detección de la proteína transcrita a partir del producto de expresión. La ausencia de telomerasa detectable ya sea a nivel de actividad enzimática, a nivel proteico o a nivel de expresión génica, puede ser adecuada para caracterizar más específicamente las células descritas en la presente memoria descriptiva, también con referencia a otras CEMs que se han descrito en la bibliografía (por ejemplo, el documento US 2004/0136967 A1). "No expresa telomerasa" significa que la expresión de telomerasa no puede detectarse en la célula por medio de procedimientos del estado de la técnica disponibles en la fecha de entrada en vigor del presente documento, como en particular la qRT-RCP. Normalmente, esto significa que no se puede detectar la actividad TITE (actividad hTITE en el caso de las células humanas). Para la detección de la expresión de un gen que codifica la telomerasa, pueden utilizarse, por ejemplo, cebadores de RCP específicos para el gen hTITE (Nekani et al., 2010, Stem Cell Res., vol. 3, p. 244-254).

Cuando las células no muestran expresión de telomerasa y/o actividad de telomerasa, entonces no pueden ser mantenidas en cultivo para siempre; en tales casos, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva no es inmortal; sin embargo, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es adecuada para cultivo bajo condiciones como las descritas en los ejemplos experimentales durante al menos 12 pasajes, o un número equivalente de doblamientos de población.

Preferentemente, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva no es inmortal. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 10, la actividad telomerasa en las células descritas en la presente memoria descriptiva es relativamente baja. De este modo, se considera que las células del Ejemplo 10 no son inmortales.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva, cuando está presente en un medio de crecimiento adecuado en condiciones adecuadas, es preferentemente mitóticamente activa. Más preferentemente, la célula se encuentra en la fase de crecimiento exponencial, esto se aplica cuando la célula en un medio de crecimiento adecuado en condiciones adecuadas. Huelga decir que una célula congelada no es mitóticamente activa; sin embargo, cuando las células congeladas descritas en la presente memoria descriptiva se descongelan y se colocan en un medio de crecimiento adecuado en condiciones adecuadas, pueden volverse mitóticamente activas y crecer preferentemente en la fase de crecimiento exponencial. Por ejemplo, cuando las células congeladas del Banco de Células Primarias (descritas en detalle más adelante) se descongelan y se colocan en un medio de crecimiento adecuado en condiciones adecuadas, se volverán mitóticamente activas y darán lugar a una multitud de células hijas, que a su vez pueden utilizarse opcionalmente para crear un Banco de Células Secundarias.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula epitelial, tal como una célula epitelial amniótica.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula endotelial.

La célula descrita en la presente memoria descriptiva, a pesar de sus excelentes propiedades proliferativas, no es una célula cancerosa.

De acuerdo con la presente descripción, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula embrionaria. En particular, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula madre embrionaria. Dañar o destruir embriones (incluidos embriones humanos) no está previsto en esta invención y no se hizo cuando se llevó a cabo la investigación subyacente a la presente invención.

Preferentemente, la célula estromal mesenquimal como se describe en la presente memoria descriptiva está sustancialmente libre de sangre o derivados de la misma, particularmente sangre de cordón umbilical. Aunque algunas CEMs son un componente del andamiaje estromal de la médula ósea, que proporciona soporte físico y funcional durante la hematopoyesis, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula hematopoyética. En particular, la célula descrita en la presente memoria descriptiva no es una célula sanguínea. Más concretamente, la célula no es ni una célula madre hematopoyética (CMH), ni una célula progenitora multipotente del sistema hematopoyético (PMP), ni una progenitora mielóide común (PMC).

También descrito, la célula como descrito en la presente memoria descriptiva no es senescente. Asimismo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por una baja senescencia. Como es generalmente conocido, la enzima β -galactosidasa es particularmente activa en las células senescentes, donde cataliza la hidrólisis de β -galactósidos en monosacáridos. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se entiende comúnmente que la actividad β -galactosidasa se atribuye a la beta-galactosidasa lisosomal endógena específicamente en las células senescentes. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, no se cree que su actividad sea en sí misma necesaria para la senescencia. Sin embargo, la actividad β -galactosidasa es fácil de detectar de manera fiable, tanto *in situ* como *in vitro*. En la presente descripción, la actividad β -galactosidasa se determina por procedimientos habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Lee et al., *Aging Cell*, vol. 5, págs. 187-195). Un sinónimo de "célula senescente" es "célula envejecida".

También descrita, la célula como se describe en la presente memoria descriptiva es una célula que ha crecido hasta el pasaje P11 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P10 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P9 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P8 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P7 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P6 o menos, más preferentemente hasta el pasaje P5 o menos, y más preferentemente hasta el pasaje P4 o menos. Como se muestra en el Ejemplo 9, las células descritas en la presente memoria descriptiva tienen excelentes propiedades proliferativas durante muchos pasajes, y como se muestra en el Ejemplo 11, las células descritas en la presente memoria descriptiva no son normalmente senescentes o sólo marginalmente senescentes durante muchos doblajes poblacionales acumulativos.

También se describe que la célula como se describe en la presente memoria descriptiva permanece multipotente durante al menos 16 duplicaciones de población acumulativas, tales como al menos 18 duplicaciones de población acumulativas, al menos 20 duplicaciones de población acumulativas, después del aislamiento. Asimismo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva sigue siendo multipotente durante al menos 12 pasajes tras su aislamiento.

También se describe que la célula como se describe en la presente memoria descriptiva permanece indiferenciada durante al menos 16 duplicaciones de población acumulativas, después del aislamiento. Asimismo, la célula descrita en la presente memoria descriptiva permanece indiferenciada durante al menos 12 pasajes tras su aislamiento.

Célula obtenible por el procedimiento de acuerdo con la invención

La célula descrita en la presente memoria descriptiva también puede caracterizarse por el procedimiento por el que se obtiene. Esto es posible porque la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva tiene propiedades que son diferentes de las células obtenidas de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente (véanse ejemplos y ejemplos comparativos en la presente memoria descriptiva) y, por lo tanto, el procedimiento para obtener la célula de acuerdo con la presente invención proporciona una célula con propiedades únicas. En particular, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede caracterizarse como una célula obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En otra descripción no mutuamente excluyente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede obtenerse por medio de un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En este caso, el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención contribuye a la definición de la célula, imponiendo características específicas a la célula, como por ejemplo el origen a partir de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical, y/o la viabilidad y/o el volumen y la superficie asociados al procedimiento de aislamiento y expansión, por citar sólo algunas características a título ilustrativo.

Las realizaciones preferentes del primer aspecto de la invención son combinables con preferencias de la célula de acuerdo con lo descrito adjunto en cada combinación, a menos que el contexto dicte de otra manera. De este modo, el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención también define, en algunas realizaciones, el producto directamente obtenido por el proceso. A veces, la célula descrita en la presente memoria descriptiva puede describirse como una célula obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Los rasgos de producto por proceso resultantes del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención son generalmente combinables con los rasgos de producto descritas en la presente memoria descriptiva.

La descripción también se relaciona con una célula obtenible por el procedimiento de la invención. A este respecto, el procedimiento define y caracteriza la célula de este modo obtenida. Preferentemente, la célula estromal mesenquimal se obtiene por aislamiento y, opcional pero preferentemente, expansión como se describe en la presente memoria descriptiva.

Célula derivada de la célula estromal mesenquimal

Además, debido a su potencial de diferenciación, las células descritas en la presente memoria descriptiva pueden utilizarse para producir células maduras o líneas celulares. Una célula madura es una célula que no tiene propiedades similares a las células madre. La diferenciación de las células estromales mesenquimales en células maduras puede desencadenarse por medio de condiciones específicas, tal como la adición de factores de crecimiento exógenos específicos al medio de cultivo; a título ilustrativo, véanse los Ejemplos 12, 13 y 14.

También, la descripción pertenece a una célula derivada de una célula mesenquimal como se describe en la presente memoria descriptiva. También se ha descrito que la célula derivada es unipotente o terminalmente diferenciada. También se ha descrito que la célula derivada no es inmortal. Los tipos preferentes de células derivadas incluyen células de linaje osteogénico, linaje adipogénico y linaje condrogénico.

5 **Población celular**

La presente descripción se relaciona con una población de células (población celular). La población celular comprende al menos una célula como se describe en la presente memoria descriptiva.

10 También descrita, la población celular como se describe en la presente memoria descriptiva es una población celular directamente obtenible por aislamiento de células de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical, como se describe en la presente memoria descriptiva. Sin embargo, es mucho más preferente que la población celular descrita en la presente memoria descriptiva sea una población celular obtenible por expansión *ex vivo* de células previamente aisladas de la Jalea de Wharton estromal del cordón umbilical, como se describe en la presente memoria descriptiva.

15 Algunas características de la población celular descrita en la presente memoria descriptiva, que se describirán a continuación, están relacionadas con las características físicas de la población celular, en particular las células comprendidas en la población. A título meramente ilustrativo, y sin perjuicio de los detalles desvelados en otras partes del presente documento, las características físicas incluyen aquellas características que pueden determinarse directamente con procedimientos físicos, como la expresión génica, el volumen o la superficie, la forma, etc. de las células, la proporción y la distribución de cualquiera de ellas dentro de la población celular. Algunas características y descripciones de la población celular, que se describirán a continuación, están relacionadas con el procedimiento por medio del cual se puede obtener u obtiene la población celular. A título meramente ilustrativo, y sin perjuicio de los detalles desvelados en otras partes del presente documento, las características de la población celular relacionadas con el procedimiento por el que se puede obtener u obtener la población celular pueden incluir (a) el origen anatómico de las células, en particular el cordón umbilical y el estroma de Jalea de Wharton como sección preferente del mismo, (b) las condiciones aplicadas para aislar las células y (c) las condiciones aplicadas para expandir la célula, por las que se obtiene una población celular.

20 La población celular descrita en la presente memoria descriptiva comprende una multitud de células. Por lo tanto, la población celular comprende al menos dos células, sin embargo, normalmente estarán comprendidas significativamente más de dos células. Aunque no existe un límite superior estricto para el número de células comprendidas en la población celular, un límite superior natural suele estar representado por el número total de células obtenibles en una serie a escala completa, a menos que se utilice más de un cordón como material de partida. Un ensayo a escala completa que comience con cordón umbilical humano y comprenda la etapa c) y se prolongue hasta el pasaje P2 suele producir al menos 1×10^9 células, más preferentemente al menos 2×10^9 células, más preferentemente al menos 3×10^9 células, más preferentemente al menos 4×10^9 células, más preferentemente al menos 5×10^9 células, más preferentemente al menos 6×10^9 células, más preferentemente al menos 7×10^9 células, más preferentemente al menos 8×10^9 células, más preferentemente al menos 9×10^9 células y, a veces, al menos 10×10^9 células. Se pueden obtener más células en pasajes posteriores.

30 La población celular comprende al menos una célula que expresa APCDD1. Normalmente, esto puede confirmarse demostrando que una muestra de la población celular es positiva para la expresión de APCDD1. En otras palabras, la población celular se caracteriza por la expresión del gen APCDD1. También se ha descrito que la mayoría de las células de la población celular expresan el gen APCDD1. Preferentemente, al menos el 80 % (por número de células), preferentemente al menos el 90 % (por número de células), más preferentemente al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % (cada una por número de células) de las células comprendidas en la población celular expresan APCDD1.

45 Opcionalmente, la célula comprende al menos una célula adicional, es decir, una o más células adicionales que son distintas de la célula descrita en la presente memoria descriptiva, en particular la célula descrita en la presente memoria descriptiva. En particular, en la presente memoria descriptiva, la al menos otra célula difiere en al menos un rasgo, obligatoria u opcional (preferente), de la célula descrita en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, sin embargo, la al menos otra célula es singénica, más preferentemente autóloga, a la célula descrita en la presente memoria descriptiva.

50 También descrito, todas las células de la población celular son CEMs. Las células de este tipo se obtienen normalmente cultivándolas más allá del pasaje inicial ("P0"). Aunque, a veces, las células aisladas originalmente del cordón umbilical comprenden CEMs de este modo como otras células (por ejemplo glóbulos rojos), las otras células no estarán presentes más allá de P0 porque (a) las células no adherentes se eliminan junto con el medio de crecimiento al final de P0, (b) el medio de crecimiento utilizado es preferentemente adecuado para la expansión de las CEMs, y (c) las células con propiedades proliferativas inferiores a las CEMs no proliferarán tan bien como las CEMs, y por lo tanto, en el transcurso de varias Duplicaciones de Población acumulativas, la población celular se enriquece en CEMs.

También descrito, la población celular comprende CEMs de este modo como no-CEMs. Las células de acuerdo con lo descrito en la presente memoria descriptiva son típicamente obtenibles inmediatamente después del aislamiento, por

ejemplo antes o durante el pasaje inicial ("P0"), y/o combinando al menos una célula de acuerdo con lo descrito en la presente memoria descriptiva con al menos otra célula.

5 Preferentemente, todas las células de la población celular proceden de la misma especie. Más preferentemente, todas las células de la población celular son células humanas. Preferentemente, todas las células de la población celular son singénicas entre sí; más preferentemente, todas las células de la población celular son autólogas entre sí. Aún más preferentemente, todas las células de la población celular proceden del mismo individuo. Dicha población celular puede obtenerse mediante el uso de un único cordón umbilical, o una fracción del mismo, como material de partida.

10 Preferentemente, la población celular no comprende CEM originarias de tejidos distintos del cordón umbilical. Más preferentemente, la población celular no comprende cantidades detectables de CEMs procedentes de secciones del cordón umbilical distintas de la Jalea de Wharton estromal. Una población celular cumple dicha característica cuando no puede detectarse en la población celular un marcador específico de células endoteliales (por ejemplo, 3G5) y un marcador específico de células epiteliales (por ejemplo, MACEp).

15 Preferentemente, la población celular comprende una multitud de células, de las cuales al menos el 80 % (por número de células), preferentemente al menos el 90 % (por número de células), más preferentemente al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % (cada una por número de células) son células como las descritas en la presente memoria descriptiva. Todas las preferencias de la célula descritas en la presente memoria descriptiva se aplican también a la población celular descrita en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o al menos el 99 %, más
20 preferentemente el 100 %, del número total de células son células tal como se definen en la presente memoria descriptiva, y opcionalmente una o más de sus preferencias, solas o en combinación. También se ha descrito que la población celular consiste esencialmente en células como las descritas en la presente memoria descriptiva. También se ha descrito que la población celular está formada exclusivamente por células como las descritas en la presente memoria descriptiva.

25 Preferentemente, la población es una población aislada de células. También se ha descrito que la población celular se encuentra fuera de un cuerpo humano o animal. Una población celular aislada es generalmente una población celular fuera de su entorno fisiológico *in vivo*. Preferentemente, la población celular es una población celular *ex vivo*. En particular, la población celular *ex vivo* se localiza preferentemente fuera del cordón umbilical. En particular, la población celular *ex vivo* está preferentemente libre de vasos sanguíneos. También se ha descrito que la población celular
30 *ex vivo* se encuentra en un recipiente de cultivo. También se ha descrito que la población celular *ex vivo* se encuentra en un recipiente adecuado para el almacenamiento, tal como un vial. También se describe que la población celular *ex vivo* se encuentra a una temperatura de aproximadamente 35 °C a 39 °C, preferentemente de aproximadamente 36 °C a 38 °C, tal como por ejemplo aproximadamente 37 °C. En una descripción no mutuamente excluyente, la población celular *ex vivo* se encuentra en un recipiente de cultivo, o en un recipiente adecuado para el
35 almacenamiento. Preferentemente, el contenedor apto para el almacenamiento es adecuado para el envío de la célula dentro de los rangos de temperatura mencionados. También se ha descrito que la población celular *ex vivo* se encuentra en un recipiente apto para la criopreservación, como un criovial, preferentemente a una temperatura de -180 °C o inferior. También se ha descrito que la población celular *ex vivo* se encuentra en un recipiente de cultivo. También se ha descrito que la población celular *ex vivo* es una población celular metabólicamente activa,
40 preferentemente en expansión.

Algunos de los rasgos de la población celular pueden describirse por medio de propiedades físicas. Para la determinación de las propiedades físicas, en general, es posible tomar una muestra de la población celular, y determinar las propiedades físicas para todas o parte de las células comprendidas en la muestra de la población celular. Dado que las poblaciones de células descritas en la presente memoria descriptiva son típicamente
45 homogéneas y/o caracterizadas en el sentido de que las células individuales que las componen son similares entre sí o muy parecidas, los resultados sobre propiedades particulares, tal como por ejemplo la expresión génica, el volumen o la superficie, la forma, etc. de las células que componen la muestra se aplicarán normalmente a las células restantes de esa población, a menos que el contexto dicte lo contrario y/o sea evidente que una población celular específica comprende células que son claramente diferentes entre sí, genotípica y/o fenotípicamente. Homogéneo en este
50 contexto significa que sustancialmente todas las células son muy parecidas o similares.

Preferentemente, la población celular se caracteriza además porque todas las células presentan características físicas esencialmente uniformes. "Esencialmente uniforme" significa que al menos el 90 % de las células, tal como al menos el 91 % de las células, tal como al menos el 92 % de las células, tal como al menos el 93 % de las células, tal como al menos el 94 % de las células, tal como al menos el 95 % de las células, tal como al menos el 96 % de las células, tal como al menos el 97 % de las células, tal como al menos el 98 % de las células, y preferentemente al menos el 91 %
55 de las células, cumplen una o más características físicas deseadas. Es particularmente deseable que el volumen celular, que se correlaciona con la luz dispersa hacia delante (LDHA) durante la citometría de flujo, como se ha descrito anteriormente, sea una característica física, que es esencialmente uniforme en la población celular como se describe en la presente memoria descriptiva.

Preferentemente, el volumen medio de las células comprendidas en la población descrita en la presente memoria descriptiva es menor que el volumen medio de las CEMs derivadas de PVJW. Las CEMs derivadas de PVJW pueden obtenerse, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos comparativos del presente documento. Una vez determinado el volumen celular para una célula individual, puede determinarse aritméticamente el volumen celular medio. Los procedimientos para determinar el volumen celular no están particularmente limitados, aunque es preferente un procedimiento basado en CCAF, particularmente como se ha descrito anteriormente en detalle para una célula individual.

La población celular se caracteriza además preferentemente porque el volumen y/o el área superficial de las células de la población celular es similar o, alternativamente, porque un alto porcentaje de las células tiene un volumen y/o un área superficial pequeños.

Preferentemente, la población celular como se describe en la presente memoria descriptiva se caracteriza por un valor LDHA promedio de 60 o menos, o valores preferentes dentro de dicho intervalo, como se describió anteriormente para una célula individual. Por ejemplo, la población celular puede caracterizarse por un valor LDHA medio de 55 o menos, tal como 50 o menos. En una descripción específica, al menos el 90 % de las células de la población celular se caracterizan por un valor LDHA de 45 +/- 10. En una descripción más específica, el valor LDHA de todas las células de la población es 45 +/- 10. Preferentemente, el valor LDHA medio de al menos el 90 % de las células de la población celular es de aproximadamente 45. Más Preferentemente, el valor LDHA medio de todas las células de la población es de aproximadamente 45. Preferentemente, la célula descrita en la presente memoria descriptiva se caracteriza por un valor LDHA menor que el valor LDHA de una célula derivada de PVJW.

Preferentemente, la superficie media de las células de la población celular no es superior a 3000 μm^2 . Preferentemente, la célula tiene una superficie no superior a 2500 μm^2 . Preferentemente, la célula tiene una superficie no superior a 2100 μm^2 . A veces, la célula tiene una superficie no superior a 2000 μm^2 . En una población de células múltiples, la superficie media se encuentra preferentemente dentro de las limitaciones en la presente memoria descriptiva indicadas. A veces, la superficie media de las células de la población celular es preferentemente de 1000 a 300 μm^2 , preferentemente de 1100 a 2700 μm^2 , preferentemente de 1200 a 2500 μm^2 , preferentemente de 1300 a 2200 μm^2 , preferentemente de 1400 a 2000 μm^2 , preferentemente de 1500 a 1900 μm^2 , más preferentemente de 1600 a 1800 μm^2 , y más preferentemente de ca. 1700 μm^2 .

Preferentemente, la población celular se caracteriza además porque al menos el 70 % de las células (por número de células), preferentemente al menos el 80 % (por número de células), preferentemente al menos el 90 % (por número de células), más preferentemente al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % (cada una por número de células) son viables. "viable" designa una célula que no es apoptótica. De este modo, a su vez, la población celular comprende células apoptóticas en una proporción del 30 % o menos del número total de células, preferentemente del 20 % o menos del número total de células, más preferentemente del 10 % o menos del número total de células, y lo más preferentemente del 5 % o menos del número total de células. También se ha descrito que la población celular no comprende ninguna célula apoptótica. Un marcador adecuado de células apoptóticas es el 7AAD (véase, por ejemplo, el ejemplo 3). También se ha descrito que la viabilidad se determina inmediatamente después del aislamiento de las células, es decir, antes de la expansión. Un alto porcentaje de viabilidad representa una ventaja con respecto a las poblaciones de CEMs descritas anteriormente.

Preferentemente, la población celular se caracteriza además porque al menos el 60 % de las células (en número de células), al menos el 70 % de las células (en número de células), preferentemente al menos el 80 % (en número de células), preferentemente al menos el 90 % (en número de células), más preferentemente al menos el 95 %, como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % (cada una en número de células) son multipotentes.

También descrito, la población celular comprende mastocitos en una proporción de 2 % o menos del número total de células, preferentemente 1 % o menos del número total de células. Lo más preferente es que la población celular no incluya mastocitos.

También descrito, la población celular comprende fibroblastos en una proporción del 2 % o menos del número total de células, preferentemente el 1 % o menos del número total de células. Lo más preferente es que la población celular no incluya fibroblastos. En la presente memoria descriptiva, el término "fibroblastos" debe entenderse en sentido estricto, para referirse a aquellas células que ya se han diferenciado en fibroblastos y excluir aquellas células que son multipotentes y tienen la mera capacidad de diferenciarse en fibroblastos.

También descrita, la población celular comprende células del linaje hematopoyético en una proporción de 2 % o menos del número total de células, preferentemente 1 % o menos del número total de células. Más preferentemente, la población celular no comprende células del linaje hematopoyético. En una descripción preferente, la célula no comprende ninguna célula sanguínea, como por ejemplo una célula sanguínea de la sangre del cordón umbilical. Varios marcadores están bien establecidos para las células sanguíneas, y por lo tanto, el cumplimiento de esta descripción preferente puede ser fácilmente probado.

También descrito, la población celular comprende células perivasculares en una proporción de 2 % o menos del número total de células, preferentemente 1 % o menos del número total de células. Lo más preferente es que la población celular no incluya ninguna célula perivascular. Un marcador de las células perivasculares es 3G5. Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador 3G5 y/o ninguna célula que muestre 3G5 en su superficie. También se ha descrito que la población celular no está contaminada con células perivasculares. También se ha descrito la expresión de 3G5 en CEM derivadas de médula ósea (Khan et al., J. Orthop. Res., 2010, vol. 28, p. 834-40). Por lo tanto, la no expresión de 3G5 también puede ser adecuada para discriminar una población celular como la descrita en la presente memoria descriptiva de poblaciones de CEM derivadas de médula ósea. También se ha descrito que la población celular no está contaminada con células perivasculares. También se ha descrito que la población celular no comprende CEMs derivadas de médula ósea.

También descrito, la población celular comprende células epiteliales en una proporción del 2 % o menos del número total de células, preferentemente el 1 % o menos del número total de células. Más preferentemente, la población celular no comprende ninguna célula epitelial. Un marcador de las células epiteliales es la molécula de adhesión de células epiteliales (MACEp). Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador MACEp y/o ninguna célula que muestre MACEp en su superficie. También se ha descrito que la población celular no está contaminada con células epiteliales.

También descrita, la población celular comprende células endoteliales en una proporción de 2 % o menos del número total de células, preferentemente 1 % o menos del número total de células. Más preferentemente, la población celular no comprende ninguna célula endotelial. Un marcador de las células endoteliales es el CD31. Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese el marcador CD31 y/o que muestre CD31 en su superficie. También se ha descrito que la población celular no está contaminada con células endoteliales.

También descrito, la población celular comprende glóbulos rojos en una proporción del 2 % o menos del número total de células, preferentemente del 1 % o menos del número total de células. Lo más preferente es que la población celular no incluya ningún glóbulo rojo. Los marcadores de los glóbulos rojos son la globina y el BGP1. Por lo tanto, esto puede describirse alternativamente en que la población celular no comprende ninguna célula que exprese la BGP1 y/o la globina. También se ha descrito que la población celular no está contaminada con glóbulos rojos.

Preferentemente, menos del 10 % de las células comprendidas en la población celular muestran actividad telomerasa, más preferentemente menos del 5 % de las células comprendidas en la población celular muestran actividad telomerasa, y más preferentemente menos del 2,5 % de las células comprendidas en la población celular muestran actividad telomerasa. La determinación de la actividad de la telomerasa y los aspectos relacionados con ella se describen anteriormente y también se aplican a esta parte de la descripción. Las poblaciones celulares respectivas pueden distinguirse de otras poblaciones celulares descritas anteriormente (por ejemplo, en el documento US 2004/0136967 A1).

También descrita, la población celular se caracteriza además en que ninguna célula contenida en ella, o, más específica y preferentemente ninguna CEM contenida en ella, muestra MHC II en su superficie, o expresa MHC II. De este modo, preferentemente, ninguna CEM de la población celular no expresa MHC II. También se ha descrito que la expresión de MHC II puede ser adecuada para distinguir la población celular descrita en la presente memoria descriptiva de otras poblaciones celulares que contienen CEM (véase, por ejemplo, Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229).

Preferentemente, la población celular se obtiene por un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en particular cuando comprende la etapa (c), es decir, la etapa de expansión. De este modo, el procedimiento de acuerdo con la presente invención, que comprende la etapa (c), puede producir una población de células estromales mesenquimales. Los rasgos producto por proceso resultantes del procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención son generalmente combinables con los rasgos del producto de acuerdo con las descripciones de la presente memoria descriptiva. Alternativa o adicionalmente, la población celular descrita en la presente memoria descriptiva puede describirse como una población celular obtenible por el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende la etapa (c).

Preferentemente, la población de células estromales descrita en la presente memoria descriptiva está esencialmente libre de agentes contaminantes. Una población de células estromales esencialmente libre de agentes contaminantes se define en la presente memoria descriptiva como una población celular esencialmente libre de agentes infecciosos tales como virus (encapsulados y no encapsulados), parásitos, bacterias y endotoxinas, es decir, una población celular que contiene dichos agentes infecciosos en una cantidad que no puede detectarse con sistemas de identificación basados en cultivos, serológicos o moleculares o con la prueba de LAL (endotoxinas).

Preferentemente, la población celular descrita en la presente memoria descriptiva está esencialmente libre de antibióticos. Se puede obtener una población celular esencialmente libre de antibióticos cultivando las células durante al menos un pasaje en ausencia de antibióticos. Por ejemplo, incluso si los antibióticos están presentes en el primer pasaje después del aislamiento de las células ("P0"), los antibióticos se suspenden preferentemente para todos los

pasajes después de P0; en otras palabras, por ejemplo, el medio de crecimiento MBQDCM con 5 % LPh puede utilizarse sin adición de antibióticos para P1 y todos los pasajes posteriores.

5 También descrito, la población celular *ex vivo* es congelada. Las células congeladas suelen almacenarse a temperaturas de -180 °C o inferiores, aunque cualquier condición adecuada para almacenar células es adecuada para ello. Las células pueden congelarse, preferentemente en nitrógeno líquido. Puede añadirse un crioprotector antes de la congelación. También se ha descrito que la población celular se almacena en nitrógeno líquido. Preferentemente, la población de células congeladas es un banco de células. A continuación se describe con más detalle.

Banco de células

10 Como se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 6, las células descritas en la presente memoria descriptiva se caracterizan de forma fiable por un fenotipo específico también para diferentes aislamientos de cordones umbilicales individuales, y mantienen el fenotipo específico a lo largo de varias duplicaciones de población acumulativas. De este modo, las células obtenibles de acuerdo con la invención o pertenecientes de otro modo a la presente invención tienen de forma fiable un fenotipo específico y mantienen ese fenotipo durante la expansión a lo largo de muchos pasajes. Por lo tanto, las células descritas en la presente memoria descriptiva son especialmente adecuadas para la creación de un banco de células.

15 De hecho, preferentemente, la población celular descrita en la presente memoria descriptiva es un banco celular. De este modo, la población celular descrita en la presente memoria descriptiva puede adoptar la forma de un banco celular. El banco celular comprende células derivadas de JWE. A menos que se especifique lo contrario, la población celular comprendida en el banco celular corresponde generalmente a la población celular descrita anteriormente. 20 Preferentemente, el banco de células comprende una multitud de células, de las cuales al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % o al menos el 99 %, más preferentemente el 100 %, del número total de células son células como las definidas en la presente memoria descriptiva, y opcionalmente una o más de su descripción preferente, solas o en combinación.

25 El banco de células descrito en la presente memoria descriptiva puede obtenerse por medio de un procedimiento que comprende la expansión de células derivadas de JWE de acuerdo con la invención. Alternativamente, puede mantenerse un banco de células recién aisladas (células no expandidas), del que opcionalmente pueden obtenerse células expandidas en una fase posterior. Preferentemente, sin embargo, el banco de células comprende células expandidas, es decir, células obtenibles por el procedimiento de la invención que incluye la etapa (c).

30 El banco celular comprende preferentemente células no adherentes. Dicho banco celular puede obtenerse por medio de un procedimiento que comprende el desprendimiento enzimático, por ejemplo la tripsinización, de células adherentes antes de producir el banco celular. El desprendimiento enzimático puede realizarse por procedimientos de acuerdo con el estado de la técnica.

35 También descrito, un banco celular es generado después de que las células han crecido por 5 a 30 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0), tal como 8 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

El banco de células se mantiene, de manera que algunas o todas las células pueden ser retiradas del banco de células y/o usadas, por ejemplo para cultivo adicional, en un punto deseado en el tiempo, tal como un punto futuro en el tiempo.

40 Cuando una población celular es "mantenida", esto puede ser hecho en cualquier condición que no interfiera con el futuro cultivo de la población celular; las poblaciones celulares pueden ser mantenidas en forma congelada o no congelada; para el banco celular como se describe en la presente memoria descriptiva, sin embargo, el mantenimiento en forma congelada es preferente.

45 Preferentemente, el banco de células descrito en la presente memoria descriptiva es un banco de células congeladas. Las células congeladas suelen almacenarse a temperaturas de -180 °C o inferiores, aunque cualquier condición adecuada para almacenar células es adecuada para ello. Las células pueden congelarse, preferentemente en nitrógeno líquido. Puede añadirse un crioprotector antes de la congelación. Las células pueden almacenarse en cualquier condición adecuada, aunque la congelación a temperaturas de -180 °C o menos es lo más típico.

50 El banco celular típicamente contiene células contenidas en múltiples alícuotas separadas, como en múltiples viales individuales. Preferentemente, cada vial comprende una suspensión de células. Cualquier líquido que sea adecuado para suspender células estromales mesenquimales, en particular el medio de crecimiento, y preferentemente el medio de crecimiento adecuado para la presente invención, son adecuados para resuspender las células descritas en la presente memoria descriptiva. Preferentemente, el banco celular comprende un líquido que comprende un medio basal para el cultivo de células estromales mesenquimales, tal como por ejemplo MBQDCM, o un medio basal 55 sustancialmente equivalente al mismo. Preferentemente, el líquido en el que se suspenden las células del banco celular comprende además lisado de plaquetas, por ejemplo, 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas (LP), y en el caso de células humanas, lisado de plaquetas humanas (LPh).

ES 2 985 827 T3

Los bancos de células o sus alícuotas pueden utilizarse en un momento futuro, por ejemplo, para inocular un subcultivo, por ejemplo, en un biorreactor de producción.

5 Descripciones típicas del banco celular como se describe en la presente memoria descriptiva incluyen un Banco Celular Primario (BCP) y un Banco Celular Secundario (BCS). De este modo, el banco de células descrito en la presente memoria descriptiva se selecciona preferentemente entre un Banco de Células Primario (BCP) y un Banco de Células Secundario (BCS).

En el sentido más amplio, el término "Banco de Células Primarias" se relaciona con el primer banco de células, más preferentemente primer banco de células congeladas, que está siendo preparado después del aislamiento de las células del cordón umbilical.

10 También descrito, un Banco de Células Primarias es generado después de que las células han crecido de 5 a 14 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

15 Un Banco de Células Primarias (BCP) se presenta típicamente en forma de alícuotas. Las alícuotas se preparan tras el respectivo pasaje anterior (por ejemplo, P2) y el desprendimiento enzimático, como, por ejemplo, tripsinización, centrifugación y resuspensión. Preferentemente, las células para el Banco de Células Primarias se alícuotan en 100-300 viales, como 150-200 viales, como 160 a 180 viales, o más exactamente 165 a 175 viales.

Preferentemente, cada vial del Banco de Células Primarias comprende de 1×10^6 células a 1×10^7 células, preferentemente de 5×10^6 células a 500×10^6 células, preferentemente de 10×10^6 células a 100×10^6 células, preferentemente de 15×10^6 células a 50×10^6 células, preferentemente de 18×10^6 células a 30×10^6 células, tal como unas 20×10^6 células.

20 Preferentemente, el volumen contenido en cada vial está comprendido entre 1 y 100 ml, como por ejemplo entre 2 y 20 ml, preferentemente entre 3 y 10 ml, y más preferentemente alrededor de 4 ml.

En una descripción ilustrativa, el Banco de Células Primarias obtenido después de una Corrida a Escala Completa consiste en 150 a 200 viales, cada uno conteniendo 20×10^6 células, y cada uno conteniendo 4 ml de líquido (congelado) comprendiendo las células.

25 También es posible llenar la suspensión de células destinada al Banco de Células Secundario en viales o contenedores de diferente tamaño o contenido o con una cantidad o concentración diferente de células. No obstante, las cantidades anteriores son indicativas de lo que puede obtenerse típicamente en una ejecución a escala real, y pueden calcularse conversiones a viales o recipientes de tamaño o contenido diferentes o a una cantidad o concentración diferente de células.

30 En el sentido más amplio, el término "Banco de Células Secundario" se relaciona con el segundo banco de células, más preferentemente segundo banco de células congeladas, que está siendo preparado tras el aislamiento de las células del cordón umbilical; en otras palabras, el primer banco de células, más preferentemente primer banco de células congeladas, que está siendo preparado a partir de todas o parte de las células comprendidas en el Banco de Células Primario.

35 También descrito, un Banco de Células Secundario es generado después que las células han crecido por 14 a 25 Duplicaciones de Población acumulativas (sin contar las Duplicaciones de Población acumulativas durante P0).

Dado que el Banco de Células Primarias comprende normalmente múltiples alícuotas de células, que pueden ser utilizadas en el mismo o en diferentes momentos para su posterior cultivo, es posible generar múltiples Bancos de Células Secundarias, simultánea o secuencialmente, a partir de un Banco de Células Primarias.

40 Por ejemplo, es posible generar a partir de cada vial comprendido en el Banco de Células Primario un Banco de Células Secundario. Por ejemplo, es posible generar, a partir de un Banco de Células Primarias, de 100 a 300 Bancos de Células Secundarias, como de 150 a 200 Bancos de Células Secundarias, como de 160 a 180 Bancos de Células Secundarias, o más exactamente de 165 a 175 Bancos de Células Secundarias.

45 Un Banco Celular Secundario (BCS) se presenta típicamente en forma de alícuotas. Se preparan alícuotas tras el respectivo pasaje anterior (por ejemplo, P4) y tratamiento enzimático, como por ejemplo tripsinización, centrifugación y resuspensión. Preferentemente, las células para el Banco de Células Secundario se alícuotan en viales de 100 a 300, tal como por ejemplo de 150 a 200 viales, tal como por ejemplo de 160 a 180 viales, o más exactamente de 165 a 175 viales.

50 Preferentemente, cada vial del Banco de Células Secundarias comprende de 1×10^6 células a 1×10^7 células, preferentemente de 5×10^6 células a 500×10^6 células, preferentemente de 10×10^6 células a 100×10^6 células, preferentemente de 15×10^6 células a 50×10^6 células, preferentemente de 18×10^6 células a 30×10^6 células, tal como unas 20×10^6 células.

Preferentemente, el volumen contenido en cada vial del Banco de Células Secundarias está entre 1 y 100 ml, tal como entre 2 y 20 ml, preferentemente entre 3 y 10 ml, y más preferentemente alrededor de 4 ml.

También es posible llenar la suspensión celular destinada al Banco Celular Secundario en viales o recipientes de diferente tamaño o contenido o con una cantidad o concentración diferente de células. No obstante, las cantidades anteriores son indicativas de lo que puede obtenerse típicamente en una ejecución a escala real, y pueden calcularse conversiones a viales o recipientes de tamaño o contenido diferentes o a una cantidad o concentración diferente de células.

Aplicabilidad industrial

Las células de mamíferos con propiedades proliferativas, y sus respectivas poblaciones celulares, son valiosas para actividades no comerciales y comerciales, como las actividades de investigación. Las células descritas en la presente memoria descriptiva resultan especialmente atractivas para tales fines, entre otras cosas por la buena reproducibilidad del procedimiento, las excelentes propiedades proliferativas y el alto rendimiento de las células. Las poblaciones celulares descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser adecuadas para fabricar productos celulares, por ejemplo, para investigación o usos comerciales. Por ejemplo, es industrialmente factible preparar un Banco de Células Primarias o un Banco de Células Secundarias y ofrecer comercialmente dicho Banco de Células, o más típicamente alícuotas individuales del mismo, comercialmente para fines de investigación, como por ejemplo ensayos *in vitro* basados en células.

Además de eso, es posible ejecutar todo o parte del procedimiento de la invención de manera automatizada, mediante el uso de máquinas, incluyendo robots, para la ejecución de una o más etapas del proceso. De este modo, también el procedimiento de la invención es susceptible de aplicación industrial.

En ocasiones, las células descritas en la presente memoria descriptiva pueden cultivarse y expandirse *in vitro*, por ejemplo, con fines de investigación o producción. Por ejemplo, la célula tal como se describe en la presente memoria descriptiva, o las células derivadas de la misma, pueden utilizarse para detectar la eficacia y/o la citotoxicidad y/o el mecanismo de acción de compuestos y composiciones farmacéuticos y/o para estudiar el mecanismo de una determinada enfermedad y/o para la transferencia *in vitro* de genes y/o para producir biomoléculas, como proteínas, incluidas proteínas terapéuticamente activas.

Las células descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser cultivadas como cultivo puro, o co-cultivadas con otras líneas celulares, primarias o secundarias.

Además, debido a su potencial de diferenciación, las células pueden utilizarse para producir células maduras o líneas celulares. La diferenciación de las células estromales mesenquimales en células maduras puede desencadenarse por medio de condiciones específicas, como la adición de factores de crecimiento exógenos específicos al medio de cultivo.

Los siguientes ejemplos y figuras tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención, que queda definida por las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 0: Materiales y procedimientos comunes a varios aspectos de la invención

En todos los ejemplos experimentales, a menos que se indique lo contrario, se utilizó MBQDCM o un medio basal sustancialmente equivalente al mismo. A continuación se describen medios ejemplares.

Medio basal MBQDCM y medio de crecimiento que comprende el mismo

El medio basal MBQDCM está disponible comercialmente en Lonza (Wakersville, MD, USA; Cat. Núm. 95062-688). De acuerdo con el fabricante, es libre de suero, está optimizado para la expansión en múltiples pasajes de todos los tipos de células madre mesenquimales humanas, admite la diferenciación multilineal y no requiere una matriz de fijación para el enchapado de las células. También son adecuados los medios basales sustancialmente equivalentes a MBQDCM.

"MBQDCM/GA" se prepara como sigue:

- 500 ml MBQDCM (Lonza)
- 0.5 ml GA1000 (Lonza; de acuerdo con el fabricante, GA1000 contiene 30 mg/ml de Gentamicina y 15 µg/ml de Anfotericina)

"MBQDCM/LPh" - a menos que se indiquen específicamente cantidades o proporciones divergentes - contiene 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas (LPh), y 2 U/ml de heparina, ambos añadidos a MBQDCM (es decir, sin los antibióticos Gentamicina y Anfotericina). La LPh se prepara convenientemente a partir de una composición que comprende entre $3,8 \times 10^9$ plaquetas/ml y $1,2 \times 10^9$ plaquetas/ml, en promedio ca. $7,9 \times 10^8$ plaquetas/ml; dicho lisado de plaquetas puede obtenerse, por ejemplo, del Banco de Sangre Policlínico de Módena (Italia) o de cualquier otro proveedor.

"MBQDCM/GA/LPh" - a menos que se indiquen específicamente cantidades o proporciones divergentes - contiene 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas (LPh), y 2 U/ml de heparina, que se añaden ambos a MBQDCM/GA (es decir, con los antibióticos Gentamicina y Anfotericina).

5 No se añaden factores de crecimiento (distintos de los eventualmente incluidos en la LPh y/o en el medio basal), a menos que se indique explícitamente lo contrario.

Los medios anteriores son particularmente adecuados para expandir las células como se describe en la presente memoria descriptiva.

Recuento de células

10 Para la determinación del número de células, a menos que se indique lo contrario, las células se cuentan por medio de Contadores Celulares automatizados, tal como en particular el NucleoCounter®. Si es necesario, las células se separan enzimáticamente, por ejemplo por medio de tripsinización, antes del recuento celular. Si no se desea contar los glóbulos rojos, el recuento celular se realiza después de que la población celular haya sido sometida a un tratamiento con cloruro de amonio; se sabe que dicho tratamiento lisifica los glóbulos rojos. Como resultado, se puede determinar el número total de células de una población, excepto los glóbulos rojos. Para ello, la solución de cloruro de amonio recomendada para la lisis de hematíes está disponible comercialmente a través de múltiples proveedores (por ejemplo, STEMCELL Technologies). Dicha solución puede añadirse y utilizarse siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1: Segmentación y seccionamiento del cordón umbilical, y obtención de estroma picado de Jalea de Wharton

20 Obtenga un cordón umbilical humano de un nacimiento a término. Acepte el cordón si el peso total es igual o superior a 40 g. Segmente el cordón cortándolo perpendicularmente en segmentos de unos 2,5 cm de longitud con un bisturí estéril afilado. Enjuague los segmentos de cordón umbilical con solución salina amortiguada con HEPES (SSAH) + 300 µg/ml de gentamicina y 0,15 µg/ml de anfotericina B durante un total de 10 min. Utilice agitación mecánica para lavar la sangre del tejido.

25 Para cada segmento de este modo obtenido, se procede a obtener la sección de Jalea de Wharton estromal de la siguiente manera: se realiza una incisión longitudinal en el cordón y se retiran los vasos con la matriz inmediatamente circundante de típicamente 3 mm (zona vascular-perivascular, también denominada Jalea de Wharton vascular-perivascular - PVJW) y se descartan. La extirpación debe realizarse con cuidado, en el sentido de que debe evitarse la apertura de los vasos y/o la pérdida de células vasculares o perivasculares. Evita tirar de la matriz del cable.

30 Antes de recoger el tejido matriz, vuelva a examinar ópticamente cada segmento de tejido para asegurarse de que se ha eliminado completamente el PVJW. No deben quedar vasos ni fragmentos de vasos en el segmento.

Una vez que la PVJW ha sido removida de los segmentos del cordón umbilical, recorte pedazos de tejido matriz de los segmentos del cordón umbilical usando tijeras afiladas. Raspar la superficie interior de los segmentos de cordón con un bisturí afilado para obtener el tejido matricial restante. La fina membrana epitelial amniótica que queda tras el raspado se retira con mucho cuidado y se desecha. La capa subamniótica (o mesenquimal) del revestimiento del cordón umbilical se incluye en la JW que se aísla. Esto se consigue raspando cuidadosamente el tejido del epitelio amniótico; es importante tener cuidado de no incluir trozos de la membrana epitelial amniótica al recoger dicho tejido. El tejido así obtenido es la Jalea de Wharton estromal pura (JWE).

40 Picar finamente la JWE de este modo obtenida (recortada y raspada) con tijeras afiladas y/o bisturí. Añadir solución salina amortiguada con HEPES (SSAH) al tejido picado. Ponga el tejido picado en una placa de Petri.

45 Para extraer JWE, se tiene cuidado durante la extracción para evitar extraer células de la UC-sangre, células epiteliales o endoteliales y células de la estructura vascular. A efectos de control (opcional pero recomendable, sobre todo cuando se reelabore este ejemplo por primera vez), un marcador para las células endoteliales es CD31; un marcador para las células epiteliales es la molécula de adhesión de células epiteliales (MACEp), un marcador para las células perivasculares es 3G5.

Las etapas del Ejemplo 1 se muestran en la Fig. 3.

50 El procedimiento de la presente invención, como se ejemplifica en el Ejemplo 1, produce Jalea de Wharton pura a través de la extracción y eliminación seccional completa de los componentes del cordón que no son Jalea de Wharton (tales como la membrana de revestimiento del cordón umbilical/membrana amniótica, vasos y sangre), evita la extracción de células de UC-sangre, células epiteliales o endoteliales y células de la estructura vascular. Esto permite obtener tejido de Jalea de Wharton puro (tejido JW). Debido a su origen, este tejido específico de la JW es el tejido estromal de la JW.

Ejemplo 2A: Tratamiento enzimático

Material y procedimientos: El tejido de la JW obtenido como se describe en el Ejemplo 1 se utilizó para aislar de él células primarias derivadas de la JW, como se indica a continuación: La mezcla de tejido picado/SSAH se suspendió en Amortiguador de Digestión (véase la tabla) en una proporción de 100 mg de mezcla de tejido picado/SSAH por 1 mL de Amortiguador de Digestión (véase la tabla) en un tubo cónico de 250 ml. El Amortiguador de Digestión comprende una enzima adecuada para liberar las CEMs del tejido aislado.

TABLA: Formulación de 100 ml de Amortiguador de Digestión (todos los ingredientes estériles)

- 1 ml de LPh, por ejemplo, del Banco de Sangre Policlínico, Módena, Italia (preparado a partir de una composición que comprende entre $3,8 \times 10^8$ plaquetas/ml y $1,2 \times 10^9$ plaquetas/ml, por término medio ca. 7.9×10^8 plaquetas/ml)
- Heparina a una concentración final de 2 U/mL
- 1 ml de piruvato sódico (a partir de una reserva de 100 mM)
- 36 μ l 1M CaCl_2
- Preparación de colagenasa NB4 o NB6 (ambas SERVA) hasta una actividad final de 0,18 Wünsch U/ml Amortiguador de Digestión
- Medio basal (medio de crecimiento comercial para células de mamíferos, como MEMD o MBQDCM) - ad-100 ml

Se utilizó la preparación de colagenasa de SERVA (NB4, NB6), típicamente NB4. De acuerdo con el fabricante, el preparado de colagenasa NB4/NB6 es un producto natural procedente de una cepa productora de colagenasa de *Clostridium histolyticum*, y es un preparado de colagenasa que no es tóxico, que contiene colagenasa y otras proteasas. De acuerdo con el fabricante, NB4 Standard Grade (17454.02 y 17454.01 (ambos SERVA)) está diseñado para la disociación de diferentes tejidos para aislar varios tipos de células, por ejemplo, condrocitos, células musculares, células epiteliales, fibroblastos de piel, hepatocitos, adipocitos que se utilizan con fines de investigación. De acuerdo con el fabricante, el preparado de colagenasa NB4 también puede utilizarse como alternativa de bajo coste al preparado de colagenasa NB6 para establecer el procedimiento. De acuerdo con el fabricante, el preparado de colagenasa NB6 Grado BPF (NB6 BPF grade, 17454.02 (SERVA) está especialmente diseñado para el aislamiento de células para algunos fines específicos de trasplante. En todos los experimentos descritos en la presente divulgación se utilizó NB4, a menos que se especifique explícitamente lo contrario. De acuerdo con SERVA, el fabricante del preparado de colagenasa utilizado en este experimento, SERVA indica la actividad de la colagenasa en unidades PZ (PZ-U) De acuerdo con Wünsch (en la presente memoria descriptiva denominadas sinónimamente unidades Wünsch).

Se sabe que la heparina es un aditivo adecuado para composiciones líquidas que contienen lisado de plaquetas para evitar la obstrucción (por ejemplo, Lohmann et al., 2012, PLoS ONE, vol. 7e37839).

También se probaron amortiguadores de digestión con mayor actividad de colagenasa (concentración final superior a 0,18 Wünsch U/ml), inicialmente basados en la actividad de colagenasa que se ha descrito previamente para la digestión enzimática de tejido adiposo, pero la digestión en presencia de mayor actividad de colagenasa no resultó ventajosa (datos no mostrados).

El tejido picado (Ejemplo 1) se colocó en tubos estériles. Se añadió Amortiguador de Digestión (véase más arriba). Estos tubos conteniendo tejido picado y Amortiguador de Digestión (digest) se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un intervalo de tiempo de digestión de 3 horas con agitación suave constante a 75 rpm en un agitador orbital para la digestión, "digest" se relaciona con el conjunto de tejido a digerir y Amortiguador de Digestión.

Al final del intervalo de tiempo de digestión, el digerido se diluyó añadiendo 2 volúmenes de MBQDCM, suplementado con 1 % (v/v) de lisado de plaquetas humanas (LPh) y se pasó a través de dos capas de una gasa estéril para separar del tejido no digerido/parcialmente digerido. El filtrado se denominó "mezcla digerida".

La mezcla digerida se centrifuga a $680 \times g$ durante 15 minutos en tubos de centrifuga de 250 ml. Al final de la centrifugación, se elimina el sobrenadante y el pellet (que contiene células estromales mesenquimales recién aisladas de la Jalea de Wharton del cordón umbilical) se vuelve a suspender en 1-2 mL de MBQDCM/GA/LPh (véase el Ejemplo 0).

Posteriormente, se determina el número total de células. Lo más típico es que las células incluidas en la mezcla digerida no sean todas CEM:

Ejemplo 2B: Primer cultivo (P0 y opcionalmente P0+)

Las células resuspendidas del Ejemplo 2A se siembran en frascos de cultivo T-225 (Falcon®, una marca de Corning, Corning, NY, EE.UU.) en MBQDCM/GA con 5 % de LPh (véase el Ejemplo 0; 50 mL de medio por frasco T-225) para iniciar el primer cultivo *in vitro* de las células procedentes de la Jalea de Wharton estromal. Este cultivo celular se

denomina "P0". El día en que se inicia P0 se denomina "Día 0", y a partir de entonces los días se cuentan con números ascendentes. La densidad celular al inicio de P0 es de 8.000 células/cm² o más. Los cm² se relacionan con la superficie del matraz que está en el fondo y cubierta por medio de crecimiento mientras las células se cultivan en P0.

5 Alimentar las células cada 3 días a partir del Día 5 con MBQDCM/GA/LPh frescas. Alternativamente, también podría ser posible cultivar las células durante P0 en pilas, en lugar de matraces: en ese caso, se utilizan 150 mL de MBQDCM/GA/LPh por pila de 1×1 para iniciar el primer cultivo celular; sin embargo, a menos que se mencione explícitamente lo contrario, el cultivo P0 se realiza en matraces de cultivo T-225.

10 Las células se cultivan en P0 como se ha descrito hasta que la confluencia de las células sea del 80 al 90 %. Esto suele ocurrir tras un periodo de 5 a 12 días. A continuación, se tripsinizan las células. Las células se cuentan tras la tripsinización al final del pasaje.

Se evalúan los siguientes criterios de aceptación: 1 rendimiento, 2 viabilidad, 3 confluencia, 4 morfología. La determinación de los criterios de aceptación 1 y 2 se produce tras la tripsinización de las células. Los detalles son los siguientes.

Criterio de aceptación	Después de P0 y P0+	Prueba
1 Rendimiento	Al menos 8 millones de células	Recuento de células tras la tripsinización
2 Viabilidad	Más del 80 % de células viables	Tinción con 7-amino actinomicina D (7-AAD)
3 Confluencia	Al menos 80 %, preferentemente 80 a 90 % de confluencia	Determinación microscópica
4 Morfología	Mayoría de células pequeñas, fusiformes y en colonias definidas	Determinación microscópica

15 En este ejemplo experimental, deben cumplirse los cuatro criterios de aceptación. Además, en la inspección morfológica se comprueba visualmente si el tamaño y la forma de las células son relativamente uniformes. Es preferente que de este modo sea.

En caso de que uno o más de los criterios 2, 3 o 4 no se cumplan, se descarta todo el cultivo celular. Los actuales inventores han observado que normalmente se cumplen los criterios 2, 3 y 4, por lo que no es necesario descartarlos.

20 Sin embargo, la posibilidad de descartar en caso de incumplimiento garantiza que sólo se realicen pasajes posteriores si se cumplen los criterios de aceptación.

En caso de que el número total de células después de P0 sea superior a 8 millones de células (a condición de que también se cumplan los criterios de aceptación 2, 3 y 4), proceder directamente con el Ejemplo 2B.

25 En caso de que el número total de células después de P0 no sea superior a 8 millones de células (a condición de que se cumplan los criterios de aceptación 2, 3 y 4), se realiza una etapa de subcultivo adicional, denominada "P0+" o "P0 plus". (Para evitar dudas, a lo largo de este documento se indica específicamente en caso de que determinadas células se subcultivaran en una etapa "P0+"; en otras palabras, cuando no se da tal indicación específica, las células pasaron de P0 directamente a P1 (Ejemplo 2B)). Las condiciones de P0 corresponden exactamente a las condiciones de P0, descritas anteriormente, salvo que las células resuspendidas que se someten a P0+ proceden de P0, y no directamente del Ejemplo 2A.

30 Las células se cultivan en P0+ hasta que la confluencia de las células sea del 80 al 90 %. A continuación, se tripsinizan las células. Se evalúan los criterios de aceptación anteriores: 1 rendimiento, 2 viabilidad, 3 confluencia, 4 morfología. Cuando se cumplan todos los criterios, pasaje al Ejemplo 2B. Si no se cumplen uno o varios de los criterios (incluido el rendimiento), descarte las celdas. En concreto, las células se descartan si el número total de células tras P0+ no es de al menos 8 millones de células.

35 El número total de células en este ejemplo se indica en base a un cordón umbilical humano entero como material de partida (ejecución a escala completa). Si la cantidad de material de partida es diferente (por ejemplo, sólo la mitad de un cordón umbilical humano), la cantidad total de células para el criterio de aceptación 1 se ajusta aritméticamente en consecuencia.

40 Dependiendo, *entre otras cosas*, del rendimiento de células, que varía en cierta medida entre diferentes ejecuciones a escala completa, también en vista de la variación en el material biológico de diferentes individuos, las Duplicaciones de Población acumuladas durante P0 están sujetas a cierta variación.

Ejemplo 2C: Ampliación posterior (P1 y siguientes)

Se obtuvieron células tripsinizadas de P0 (o P0+, pero sólo en caso de que se describa explícitamente de este modo) en el Ejemplo 2B, como se describe en el mismo, y se subcultivaron durante uno o más pasajes, de la siguiente manera.

- 5 La primera subcultura se denomina "P1". Al final de P1, las células se tripsinizan de nuevo y se subcultivan. Este ciclo de subcultivo/tripsinización se realiza preferentemente durante 4 pasajes (el P1 cuenta como "primer pasaje"), aunque en algunos casos se han realizado hasta 12 pasajes. Cada pasaje está numerado consecutivamente, es decir, P1 sigue a P0, P2 sigue a P1, y de este modo sucesivamente. A menos que se especifique lo contrario, las células se cultivaron y subcultivaron hasta la etapa 4 (P4).
- 10 Para cada pasaje a partir de P1, todas las placas de cultivo tienen el mismo tamaño definido. En concreto, para cada pasaje, el recipiente de cultivo estaba compuesto por una pila de placas de cultivo CS5, CS10 o CS20 (Corning, Corning, NY, EE.UU.). Para cada pasaje a partir de P1, las células se cultivan en MBQDCM con un 5 % de LPh sin antibióticos (véase el Ejemplo 0; 50 mL de MBQDCM/LPh por matraz T-225). A menos que se indique lo contrario, los antibióticos se suspenden en este ejemplo para todos los pasajes después de P0; en otras palabras, en este ejemplo
- 15 MBQDCM/LPh se utiliza sin adición de antibióticos para P1 y todos los pasajes posteriores.

La densidad celular al inicio de cada pasaje es de 2.500 células/cm².

Después de cada pasaje las células son tripsinizadas. Las células se cuentan al final de cada pasaje, después de la tripsinización

- 20 En función de la densidad celular en el momento de la inoculación, la superficie base del recipiente de cultivo celular (que en conjunto definen el recuento total de células al inicio del pasaje) y el recuento total de células al final del pasaje, se pueden determinar aritméticamente los Duplicaciones de Población acumulados.

En la experiencia de los inventores, las Duplicaciones de Población acumuladas durante P1 y P2 (total de P1 más P2, pero sin incluir P0), como regla muy general, están normalmente en el intervalo de 9-13.

- 25 En la experiencia de los inventores, los Duplicados de Población acumulados durante P3 y P4 (total de P3 más P4, pero sin incluir P0, P1 y P2), como regla muy general, se encuentran normalmente en el intervalo de 6-10. En consecuencia, las duplicaciones de población acumuladas durante P1, P2, P3 y P4 (total de P1 más P2 más P3 más P4, pero sin incluir P0), como norma muy general, se sitúan normalmente entre 15 y 23.

- 30 Opcionalmente - cuando se indique específicamente en la presente memoria descriptiva - las células se congelaron después de un pasaje específico, por ejemplo P2. Las células pueden congelarse, por ejemplo, en nitrógeno líquido, de acuerdo con los procedimientos habituales. Es muy posible descongelar dichas células congeladas y, por ejemplo, someterlas a nuevos pasajes de cultivo tras la descongelación. La congelación puede producirse como lote completo o en alícuotas. La congelación en alícuotas, preferentemente en viales, es muy preferente y se hizo típicamente en este ejemplo, a menos que se especifique lo contrario.

- 35 Cuando las células son congeladas y descongeladas después de un pasaje específico, la numeración del pasaje continúa después de la descongelación. Por ejemplo, cuando las células se congelan después de P2, el siguiente pasaje tras la descongelación es entonces P3. Preferentemente, y a menos que se indique lo contrario, también el recuento de los Duplicados de Población acumulados continúa después de la descongelación.

- 40 Preferentemente, las células son alícuotadas y congeladas después de P2. Las alícuotas congeladas de este modo obtenidas están disponibles para su descongelación individual en el momento deseado. Las células congeladas, preferentemente en alícuotas, pueden denominarse Banco de Células Primarias (BCP). En otras palabras, no es necesario -y normalmente no se desea- descongelar todas las alícuotas de la BCP en el mismo momento. Por el contrario, la alícuota y la congelación individual de las alícuotas proporciona la ventaja de que las alícuotas individuales pueden ser retiradas de la congelación, descongeladas y sometidas a cultivo adicional (subcultivo, expansión adicional) en puntos individuales e individualmente deseados en el tiempo.

- 45 En un ejemplo específico de una ejecución a escala completa, se obtuvieron 168 viales (cada uno conteniendo 20 × 10⁶ células, 4 ml de contenido) después de P2, partiendo de un cordón umbilical humano como material inicial. Cada uno de los viales se puede congelar, y los viales individuales se pueden descongelar en puntos temporales individuales para su posterior subcultivo, por ejemplo, P3 y en adelante. En un ejemplo específico de ejecución a escala completa, un vial obtenido y congelado después de P2 se descongela y las células contenidas en él se someten a P3 y P4. En
- 50 ese ejemplo concreto, después de P4, se obtuvieron 168 viales (cada uno con 20 × 10⁶ células, 4 ml de contenido).

Las células se cultivan en cada pasaje como se ha descrito hasta que la confluencia de las células sea del 80 al 90 %. Esto suele ocurrir tras un período de unos 3-4 días. A continuación, se evalúan preferentemente los siguientes criterios de aceptación: 1 rendimiento, 2 viabilidad, 3 confluencia, 4 morfología. La determinación de los criterios de aceptación 1 y 2 se produce tras la tripsinización de las células. Los detalles son los siguientes.

Criterio de aceptación		Después de P1 y todos los pasajes siguientes a P1	Prueba
1	Rendimiento (escala completa)	Después de P1: al menos 225×10^6 células	Recuento de células tras la tripsinización
		Después de P2: al menos 7×10^9 células (*)	
		Después de P3: al menos 250×10^6 células (*)	
		Después de P4: al menos 7×10^9 células (*)	
2	Viabilidad	Más del 80 % de células viables	Tinción con 7-amino actinomicina D (7-AAD)
3	Confluencia	Al menos 80 %, preferentemente 80 a 90 % de confluencia	Determinación microscópica
4	Morfología	Mayoría de células pequeñas, fusiformes y en colonias definidas	Determinación microscópica

(*) Después de P2, las células pueden congelarse en alícuotas para preparar un Banco de Células Primarias (BCP). Los números de células para P3 y P4 se indican basándose en el escenario de que P3 se inicia con un vial de la BCP, que contiene 20×10^6 células.

Es importante notar que los rendimientos obtenibles por expansión de acuerdo con la presente invención son muy altos comparados con procedimientos previamente conocidos para preparar y expandir células madre mesenquimales.

5 En este ejemplo, deben cumplirse los cuatro criterios de aceptación: si no se cumple uno de los criterios, se descarta todo el cultivo celular del pasaje respectivo. Los actuales inventores han observado que normalmente se cumplen todos los criterios 1, 2, 3 y 4, por lo que no es necesario descartarlos. Sin embargo, la posibilidad de descartar en caso de incumplimiento garantiza que sólo se realicen pasajes posteriores si se cumplen todos los criterios de aceptación.

10 En resumen, el Ejemplo 2 muestra que la Jalea de Wharton estromal mantiene las células en un estado de expansión competente. Las células estromales de Jalea de Wharton se identificaron como una fuente conveniente de células estromales potencialmente multipotentes que pueden mantenerse y expandirse en cultivo.

Ejemplos comparativos

A efectos de comparación, se aislaron células como se describe en los documentos WO 2004/072273 A y Sarugaser et al., 2005, Stem Cells, vol. 23, p. 220-229, específicamente como se describe en los siguientes Ejemplos comparativos 1, 2A, 2B y 2C.

15 Ejemplo comparativo 1

Se aislaron vasos de cordón umbilical humano. Los vasos disecados se suturaron para crear un bucle, bloqueando el pasaje del líquido hacia dentro o hacia fuera del vaso.

Ejemplo comparativo 2A

20 El bucle (Ejemplo comparativo 1) se colocó inmediatamente en un tubo de 50 mL que contenía 1 mg/mL de solución de colagenasa Sigma C-0130 en SSAF (sin Mg^{2+} y Ca^{2+}) a 37 °C. de acuerdo con la bibliografía, la colagenasa Sigma C-0130 tiene una actividad específica de 0,25-1,0 unidades FALGPA/mg sólido. A título informativo, las unidades FALGPA no son directamente convertibles aritméticamente en unidades Wünsch porque las unidades respectivas se relacionan con ensayos diferentes con sustratos diferentes; sin embargo, existe cierta experiencia general en el arte sobre cómo se relacionan las unidades Wünsch con las unidades FLGPA. Basándose en esa experiencia general, puede concluirse que la actividad total de la colagenasa utilizada en el Ejemplo comparativo 2 es mucho mayor que la actividad total de la colagenasa utilizada en el Ejemplo 2.

30 Después de 18-20 horas de incubación con colagenasa, la solución de digestión se detuvo añadiendo 2 volúmenes de SSAF y 1 mL de Suero Fetal Bovino (SFB). De este modo, la duración total del tratamiento con colagenasa en el Ejemplo comparativo 2 es mucho mayor que la duración total del tratamiento con colagenasa utilizado en el Ejemplo 2. Las muestras digeridas se filtraron para eliminar el tejido no digerido y se centrifugaron a 1.800 rpm (Beckham Coulter Allegra™ 25R) durante 15 minutos. Las células se volvieron a suspender en medio α -MEM al 75 %, SFB definido al 15 %, antibióticos al 10 %. Para lisar las células sanguíneas, se utilizó una solución de cloruro amónico (NH_4Cl), bicarbonato potásico ($KHCO_3$) y EDTA en una proporción de 1:3 v/v con la suspensión celular durante 5-10

minutos en hielo agitando suavemente. Tras centrifugar a $500 \times g$ durante 10 minutos, las células se volvieron a suspender y se contaron por medio de colorante azul tripán (0,4 %).

Ejemplo comparativo 2B

5 Las células perivasculares derivadas de Jalea de Wharton (PVJW) obtenidas como se describe en el Ejemplo comparativo 2A se sembraron a una densidad de 6.000-8.000 células/cm² y se incubaron a 37 °C en α -MEM (sin nucleósidos, Life Technologies, Waltham, MA, EE.UU., #22561-021) suplementado con 15% de SFB definido (HyClone, GE Healthcare, EE.UU., #SH30070.03) y antibióticos en una incubadora con un 5% de CO₂ y un 95% de humedad para iniciar el cultivo "P0".

10 Los medios se cambiaron por primera vez después de 5-6 días, a continuación se renovaron cada 2 días. Tras 6-10 días de cultivo, las células alcanzaron la confluencia. Al final de P0, tras un periodo de 6-10 días, las células alcanzaron la confluencia. A continuación, se tripsinizaron. El número total de células se determinó con colorante Trypan Blue (0,4 %).

Ejemplo comparativo 2C

15 Se obtuvieron células tripsinizadas del Ejemplo Comparativo 1B y se subcultivaron, como sigue. A partir del pasaje de cultivo 1 ("P1"), las células se sembraron a una densidad de 3.500-4.000 células/cm² en α -MEM con un 15 % de SFB definido. Los antibióticos deben suspenderse después de P0; en otras palabras, el medio de crecimiento se utiliza sin adición de antibióticos. Estas células se denominan células perivasculares derivadas de la Jalea de Wharton ("PVJW"). Las células mesenquimales derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW) también pueden denominarse "células mesenquimales derivadas de la zona perivascular". A menos que se especifique lo contrario, las células se cultivaron y subcultivaron hasta el pasaje 4 (P4).

20 Opcionalmente - pero sólo cuando se indica específicamente - las células se congelaron después de un pasaje específico, por ejemplo P2. Es muy posible descongelar dichas células congeladas y, por ejemplo, someterlas a nuevos pasajes de cultivo tras la descongelación.

Ejemplo 3: Análisis de las células tras la digestión

25 Las células obtenidas como se describe en el Ejemplo 2A (es decir, después de la etapa de digestión, ya sea con o sin lisado de plaquetas (LP)) se denominan células derivadas de la Jalea estromal-Wharton o "JWE". Éstas se comparan con las células de control derivadas de PVJW ("PVJW", ejemplo comparativo 2A). La JWE y la PVJW se tiñeron con la tinción 7-Amino-actinomicina-D (7AAD) (Vía Probe; BD Biosciences; utilizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para detectar la apoptosis por medio de análisis CCAF. Se adquirió muestra no teñida para detectar la autofluorescencia de la muestra y ajustar los tubos fotomultiplicadores (PMT; sensores CCAF) para todos los canales considerados. Los ajustes de compensación se establecieron por medio de la adquisición de tubos teñidos de un solo color. Los datos recogidos se analizaron con el software Diva (BD Biosciences). Estadísticas por prueba t. Los resultados se muestran en la Fig. 4A.

35 El análisis CCAF de muestras recién aisladas reveló que, para ambos protocolos de digestión basados en la preparación de NB4-colagenasa (con y sin lisado de plaquetas (LP), ver Fig. 4A), los inventores detectaron una viabilidad superior al 97 % de la población celular total. En particular, tras la digestión basada en la preparación de colagenasa NB4 sin LP (digestión de 3 horas) observaron una tasa de apoptosis del $1,5 \% \pm 1,3 \%$, y tras la digestión basada en la preparación de colagenasa NB4 con un 1 % de LP (digestión de 3 horas), las células apoptóticas fueron sólo el $1,45 \% \pm 0,3 \%$ del total de células aisladas. Sin embargo, el $30,6 \% \pm 9,6 \%$ del total de PVJW aislados de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 fueron positivos para 7AAD (Fig. 4A, barra sombreada superior a la derecha). De este modo, se pudo demostrar que las muestras tratadas con el preparado de NB4-colagenasa (SERVA) durante 3 horas eran más viables que las células aisladas como se describe en el Ejemplo comparativo 1. Esto sugiere que el protocolo de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 es más perjudicial para las células que el protocolo de acuerdo con la presente invención; es decir, mientras que el protocolo de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 conduce al aislamiento de más células, una mayor fracción de ellas es apoptótica. Las células apoptóticas no son aptas para la expansión.

45 Además, comparando el uso de lisado de plaquetas (sí/no) y no observando una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de células AAD7-positivas (Fig. 4A), los inventores pudieron demostrar que el lisado de plaquetas no influye negativamente en la actividad de la colagenasa, en la liberación de células y en su viabilidad. Sorprendentemente, la presencia de lisado de plaquetas (que normalmente comprende plasma) no tuvo ningún efecto negativo sobre la digestión ni, más concretamente, sobre el rendimiento de las células, aunque se había señalado anteriormente que el lisado de plaquetas afectaba negativamente a la actividad de determinadas enzimas, incluidas las proteasas (Chesney et al., J. Clin. Invest., 1974, vol. 53, p. 1647-1654).

55

Ejemplo 4A: Análisis de las propiedades físicas de las células derivadas de JWE aisladas de acuerdo con la presente invención en comparación con las células derivadas de PVJW

A continuación, los inventores se propusieron evaluar el número total de células y las propiedades físicas de las células derivadas de JWE aisladas de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 1 y Ejemplo 2A) frente a las células derivadas de PVJW del protocolo de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 y el Ejemplo comparativo 2A). Este estudio comparativo se basó en la evaluación de la eficacia de la colagenasa y de los parámetros físicos (por medio de CCAF) de las respectivas células recién aisladas.

En primer lugar, con respecto al número total de células recién aisladas, los inventores obtuvieron más células derivadas de PVJW por medio del procedimiento de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 que las que obtuvieron células derivadas de JWE por medio del procedimiento de acuerdo con la presente invención como se describe en el Ejemplo 1.

En segundo lugar, el análisis de los parámetros físicos por citometría de flujo, a saber, luz dispersada hacia delante (LDHA) y luz dispersada lateralmente (CSE), reveló que las células derivadas de JWE tienen una LDHA y una CSE inferiores en comparación con las células derivadas de PVJW aisladas por el procedimiento de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1. Los resultados se indican en la tabla siguiente y se visualizan en la Fig. 5A.

Tabla: CSE y LDHA determinados experimentalmente

Célula		LDHA	CSE
Células derivadas de PVJW de acuerdo con el ejemplo comparativo 2A	Media de seis muestras	75,42166667	64,65666667
	ST-DEV	18,66791951	15,1647779
	EEM	7,75	6,19
Células derivadas de PVJW de acuerdo con el ejemplo comparativo 2A	Media de cuatro muestras	46,1925	50,795
	ST-DEV	9,660766986	21,28367273
	EEM	5,58	12,29
	prueba t	0,025231608	0,296671217

En promedio, las células derivadas de JWE tienen un volumen celular menor (determinado por LDHA) con una complejidad interna menor (determinada por CSE) que las células derivadas de PVJW. La diferencia en LDHA es estadísticamente significativa. En particular, las células derivadas de JWE (de acuerdo con la presente invención, n=4) tienen un LDHA y un CSE inferiores en comparación con las células derivadas de PVJW aisladas por el procedimiento de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 y 2A (PVJW, n=6). Esta lectura de citometría de flujo indica que las células derivadas de JWE aisladas por el procedimiento de acuerdo con la presente invención se caracterizan por células pequeñas más homogéneas con baja complejidad citoplasmática, mientras que las células derivadas de PVJW se caracterizan por una población heterogénea con mayor volumen medio y mayor complejidad citoplasmática. Homogéneo en este contexto significa que sustancialmente todas las células son muy parecidas o similares. Tanto el menor volumen como la menor complejidad interna son características que indican severidad y rendimiento (véase, por ejemplo, Wagner et al., 2008, PLoS One, 2008, 3: e2213). En general, las células con una estructura interna más compleja aparecen más brillantes en el análisis de dispersión lateral, debido a las estructuras internas.

Ejemplo 4B: Fenotipo morfológico de las células recién aisladas: Las células PVJW son diferentes de las células aisladas de acuerdo con la presente invención

Se comparó la morfología de las células JWE y PVJW. Para garantizar un alto grado de comparabilidad, un único cordón se dividió en dos partes: una parte se preparó con el procedimiento descrito en los Ejemplos 1, 2A y 2B, la otra parte se preparó de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1, 2A y 2B, en ambos casos, sin embargo, las células se analizaron específicamente dos o tres días después de la siembra del pasaje de cultivo 1 (P1), (aumento original 100X).

Los inventores descubrieron que las células derivadas de la Jalea de Wharton estromal pura de acuerdo con la presente invención (JWE) son homogéneas, pequeñas y con forma de huso (Fig. 5B, izquierda), mientras que las células derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW) son grandes y tienen un citoesqueleto prominente (Fig. 5B, derecha). Las células mesenquimales derivadas de la Jalea de Wharton perivascular (PVJW) también pueden denominarse "células mesenquimales derivadas de la zona perivascular".

Ejemplo 4C: Formación de colonias de células recién aisladas: Las células PVJW son diferentes de las células aisladas de acuerdo con la presente invención

A continuación, se investigó el potencial de formación de colonias de las células descritas en la presente memoria descriptiva. Esto se hizo de la siguiente manera: Los JWE se obtuvieron como se describe en los Ejemplos 1 y 2A, los PVJW se obtuvieron como se describe en el Ejemplo comparativo 1. A continuación, mediante el uso de un embudo estéril, el extracto que contiene células se filtra a través de dos capas de una gasa estéril para eliminar el tejido no digerido. Centrifugar a 680 × g durante 15 minutos mediante el uso de tubos de centrifuga de 250 ml. Desechar el sobrenadante (verter o aspirar con poco vacío). Volver a suspender el precipitado en 1-2 mL de MBQDCM/GA/LPh (véase el Ejemplo 0). Colocar las células resuspendidas en 3 × matraces T225 o 1x 1 pila en medio MBQDCM/GA/LPh (véase el Ejemplo 0; 50 mL de medio por matraz T-225 o 150 mL por pila 1x1) para iniciar el cultivo P0. No mueva el cultivo P0 durante los primeros 5 días tras la siembra. Cambiar el medio después de 5 días. A partir de entonces, alimentar cada 3 días con MBQDCM/GA/LPh. Recoger las células P0 el día 12 con 3 U/mL de tripsina y neutralizar con MSCBM + 1 % de LPh. Los resultados se muestran en la Fig. 5 C. Estos resultados demuestran que el protocolo de aislamiento celular de acuerdo con la presente invención genera una población celular más homogénea capaz de generar colonias más compactas tras la siembra inicial (Pasaje 0).

Ejemplo 5: Comparación de células derivadas de JWE de acuerdo con la presente invención frente a células derivadas de médula ósea (MO).

CEM derivadas de médula ósea (MO-CEM, obtenidas de acuerdo con lo descrito por Grisendi et al., *Cytotherapy*, 2010, vol., 12, p. 466-477, se sembraron a una densidad de 6.000 células/cm². Las células derivadas de JWE descritas en la presente memoria descriptiva (Ejemplos 1, 2A, 2B y 2C, cultivadas específicamente hasta el pasaje 5 (P5), se sembraron a una densidad de 2.800 células/cm². Al cabo de 2-3 días de cultivo eran subconfluentes, y se adquirieron cinco imágenes representativas de ambos tipos celulares. En particular, las CEM plástico-adherentes se visualizaron con el microscopio Axioskop-Observer-1 (Zeiss) mediante el uso de un objetivo de 10 aumentos, equipado con una cámara AxioCam. Las imágenes se adquirieron y procesaron con el software AxioVision 4.8.2 para evaluar el área celular. (Moore et al., *Exp. Eye Res.* 2013, vol. 115, p. 178-188; Zeilbeck et al., *PLoS One.*, 2014; vol. 9(4), e95546).

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se comprobó que las células derivadas de JWE, tal y como se describe en la presente memoria descriptiva, tienen una superficie media menor que las CEM extraídas de MO.

Ejemplo 6: Marcadores de superficie celular de células recién aisladas

Materiales y procedimientos: Se sometieron tres cordones umbilicales a dos procedimientos diferentes (estado de la técnica de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 y 2A, "PVJW" frente a células de acuerdo con la presente invención, véanse los Ejemplos 1 y 2A, "JWE").

Inmediatamente después del aislamiento, se contaron las células derivadas de PVJW/JWE y se resuspendieron en 1mL de SSAF 1X en tubos de polipropileno para análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF) (200.000 células/tubo). Las células se incubaron en 100 µl de amortiguador de bloqueo que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco (MEMD), 10 % de suero bovino fetal (SFB), 0,1 M de azida sódica y 66,6 mg/mL de inmunoglobulina G humana durante 20 minutos en hielo. Posteriormente se lavaron en 1 ml de 1 × SSAF y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos.

Posteriormente, las muestras se tiñeron durante 30 minutos en hielo con anticuerpos primarios en 90 µl de SSAF con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma) y se analizaron con un citómetro de flujo FACSAria III (BD Biosciences) equipado con dos láseres refrigerados por aire a longitudes de onda de 488 y 633 nm. Para la tinción indirecta (sólo para anti-GD2), se utilizó un anticuerpo secundario de rata anti-ratón conjugado con alofococianina (APC) (BD Pharmingen). la tinción con 7-amino-actinomicina-D (7AAD) (ViaProbe; BD Biosciences; utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante) se evaluó por medio de citometría de flujo para detectar la apoptosis. Se adquirió muestra no teñida para detectar la autofluorescencia de la muestra y ajustar la PMT para todos los canales considerados; la diafonía fluorescente se controla por medio de ajuste de compensación. Los ajustes de compensación se establecieron adquiriendo tubos teñidos de un solo color. Los datos recogidos se analizaron con el software Diva (BD Biosciences).

Resultados: El análisis inmunofenotípico de las muestras recién aisladas reveló que, para ambos procedimientos de aislamiento, los inventores identificaron CD105, CD73 y CD90, que son la expresión de antígenos de superficie típica de las CEMs. Del mismo modo, se detectó el receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (CD140b) tras ambos procedimientos de aislamiento. No se detectó ALH-DR en ambas muestras, sin embargo, se observó que las células derivadas de PVJW expresaban 3G5, mientras que las derivadas de JWE no lo hacían, lo que indica que el procedimiento de acuerdo con la presente invención no conduce al aislamiento de células perivasculares, de acuerdo con el origen de las células en el estroma de la Jalea de Wharton. La visualización relativa de algunos marcadores de superficie se muestra en la Fig. 7 A, panel izquierdo. En la Fig. 7A, panel derecho, se indican algunos marcadores de superficie que se expresan/no se expresan en la mayoría de las células.

También se analizaron los marcadores de la superficie celular tras el cultivo prolongado de las células. Se analizaron cultivos celulares procedentes de dos aislamientos independientes y con diferentes duplicaciones acumulativas de la población. Se encontró lo siguiente: No existen diferencias significativas en la visualización de CD105, CD90 y CD73 (marcadores positivos de las CEM) entre los distintos aislamientos celulares. Los niveles de CD105, CD90 y CD73

también son uniformemente altos en diferentes doblajes acumulativos de población (cDP). Por el contrario, CD45, CD14, CD34, CD19 y ALH-DR (conocidos por ser marcadores negativos de las CEM) se expresan a niveles muy bajos en las células de ambos aislamientos y a diferentes Doblajes de Población acumulativos (véase la Tabla siguiente).

Tabla: caracterización fenotípica por citometría de flujo (% células positivas). DPA = Duplicaciones acumulativas de la población

	CD45	CD73	HL-DR	CD14	CD34	CD90	CD105	CD19
Lote 1 después de 8 DPA	3,8	98,9	-0,6	0,0	1,1	99,2	99,1	-0,5
Lote 1 después de 16 DPA	4,1	99,1	-0,7	-0,2	1,7	99,2	99,1	-0,8
Lote 2 después de 8 DPA	1,4	99,2	-0,3	0,1	2,6	99,2	99,1	-0,2
Lote 2 después de 16 DPA	0,8	99,1	-0,2	0,7	4,2	99,1	99,10	-0,1

Estos datos muestran que las condiciones de expansión de las células estromales derivadas de JW en el procedimiento de acuerdo con la presente invención son capaces de generar poblaciones de células estromales derivadas de JW puras en alto rendimiento con un fenotipo estable a lo largo de varios Duplicaciones de Población acumulativas. Por lo tanto, las células descritas en la presente memoria descriptiva son adecuadas para la creación de un Banco de Células.

Ejemplo 7: Marcadores de superficie celular en células expandidas

Materiales y procedimientos: Para caracterizar los antígenos de superficie de las células derivadas de PVJW y de JWE, se realizó un array CCAF a partir de células contenidas en un Banco de Células, preparadas a partir del mismo cordón umbilical de acuerdo con diferentes procedimientos (Ejemplos 1 y 2A, 2B y 2C vs. Ejemplos comparativos 1 y 2A, 2B y 2C). Las células se descongelaron en P2 (Ejemplo 2C/Ejemplo comparativo 2C) y se expandieron hasta P4 (Ejemplo 2C/Ejemplo comparativo 2C) para realizar análisis CCAF. Tras el desprendimiento con una solución de desprendimiento celular de enzimas proteolíticas y colagenolíticas (Accutase, Thermo Fisher), las células se centrifugaron a 500 × g durante 10 minutos. El precipitado se volvió a suspender en medio de cultivo (MBQDCM/LPh para JWE o α-MEM con SFB definido al 15 % para PVJW) y se contó por medio de colorante Trypan Blue al 0,4 %. Las células se lavaron en 1X SSAF y se centrifugaron a 300 × g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en Amortiguador de Tinción Farmigénico BD + EDTA y se sembraron 250.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. El cribado por citometría de flujo se realizó de acuerdo con la ficha técnica del panel de marcadores de superficie celular humana (BD Lyoplate™, BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Fig. 7B.

Se probó específicamente si las células recién aisladas como se describe en la presente memoria descriptiva (Ejemplos 1, 2A) expresan CD46, CD55 y CD59. Como se muestra en la Fig. 7B, tanto las células VPWL como las JWE expresan estos reguladores superficiales del complemento. Esto coincide con descripciones anteriores, por ejemplo, de Ignatius et al., J. Cell. Biochem., 2011, vol. 112, p. 2594-2605 y Schraufstatter et al., World J. Stem Cells, 2015, vol. 7, p. 1090-1108, que habían demostrado que las CEMs derivadas de la médula ósea expresan los reguladores del complemento de la superficie celular, y se cree que las CEMs diseñadas para regular al alza CD46, CD55 y CD59 se protegen de la lisis celular mediada por el complemento *in vitro* e *in vivo*. La Fig. 7B confirma que las células descritas en la presente memoria descriptiva comparten este fenotipo de expresión particular.

Ejemplo 8: Expresión génica de las células descritas en la presente memoria descriptiva determinada por medio de RCP cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-RCP).

Materiales y procedimientos: Para este análisis se utilizaron células obtenidas de acuerdo con lo descrito en la presente memoria descriptiva (Ejemplo 2C), en particular: después del pasaje 4. El ARN celular total se aisló por medio de un procedimiento de una sola etapa con TRIzol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizó ADNc complementario de primera cadena a partir de 1 µg de ARN total mediante el uso de un conjunto de síntesis de ADNc de primera cadena revertAid H minus (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc monocatenario se cuantificó por medio de espectrofotómetro (Beckman Coulter DU® 730) para utilizar 10 ng de ADNc en cada pocillo de RCP en tiempo real.

La técnica de RCP cuantitativa en tiempo real se realizó por medio del sistema de RCP en tiempo real StepOne™ de Applied Biosystems y el reactivo Fast SYBR® Green Master Mix. La cuantificación de la expresión génica para cada gen diana y gen de referencia se realizó en tubos separados. Los cebadores directos e inversos se diseñaron con IDT PrimerQuest® (disponible en línea en <http://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), asegurándose de que abarcaban una secuencia de intrones para ser específicos del ARNm y no del ADN genómico. El nivel de expresión relativa del gen diana se normalizó con respecto al nivel de expresión del gen de referencia endógeno β-actina.

Los resultados se muestran en la Fig. 8. La Fig. 8 muestra que, por ejemplo, APCDD1, PPARG y FLVCR2, se expresan en las células derivadas de JWE. La expresión es consistente entre diferentes poblaciones celulares derivadas de JWE preparadas de acuerdo con la presente invención. Este patrón de expresión compartido indica la consistencia de las células de la presente invención desde el punto de vista de la expresión génica.

5 Notablemente, sin embargo, el patrón de expresión de estos genes difiere notablemente de las células derivadas de PVJW aisladas de acuerdo con el estado de la técnica. En particular, APCDD1 no se expresa en absoluto en las células derivadas de PVJW. Esto se deduce del hecho de que no se observó amplificación alguna del gen APCDD1 en la muestra de células derivadas de PVJW. Los inventores concluyen que por medio de TiempoReal-RCP la expresión de APCDD1 es detectable únicamente en las células derivadas de JWE descritas en la presente memoria
 10 descriptiva, pero no detectable en las células derivadas de PVJW. De este modo pues, la expresión de APCDD1 distingue claramente las células descritas en la presente memoria descriptiva de las células derivadas de PVJW.

Mientras que la literatura anterior ha sido incierta sobre si las CEMs no perivasculares son o no distintas de las CEMs perivasculares (por ejemplo, Davies et al., Stem Cells Translational Medicine, 2017, vol. 6, p. 1620-1630), este ejemplo proporciona ahora la prueba de que las células estromales derivadas de la Jalea de Wharton obtenidas de acuerdo
 15 con la presente invención son distintas de las CEMs perivasculares.

Ejemplo 9: Potencial proliferativo de las células obtenidas De acuerdo con la presente invención frente a las células de referencia células de referencia

20 Materiales y procedimientos: Cultivo celular: Las células estromales derivadas de la Jalea de Wharton (JWE) descritas en la presente memoria descriptiva, obtenidas de acuerdo con se describe en los Ejemplos 1, 2A, 2B y 2C después de P1, o las células perivasculares derivadas de la Jalea de Wharton (PVJW), obtenidas de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1, 2A, 2B y 2C, ambas poblaciones celulares obtenidas del mismo cordón umbilical, se sembraron en MBQDCM con un 5 % de LPh (véase el Ejemplo 0) sin factores de crecimiento y se colocaron en un incubador a 37 °C, 5 % de CO₂ con un 95 % de humedad. Tres días después de la siembra, y posteriormente cada 3 días, se realimentaron los cultivos. El día 4 o 5 de cada pasaje se tripsinizaron las células y se contaron.

25 Recuento celular: las células se contaron mediante el uso de colorante azul tripán al 0,4 % en una cámara Burker y se calculó la duplicación de población acumulativa (DPA) como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 9. Se observa un mayor número de doblajes de población (DP) por pasaje en las células derivadas de JWE que en las derivadas de PVJW (Figura 9A). De este modo pues, la EP en células derivadas de JWE, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, es más rápida que en células derivadas de PVJW. Se midió un aumento estadísticamente significativo de la duplicación de la población en las células derivadas de JWE en los pasajes 2, 3 y
 30 4 en comparación con las células derivadas de PVJW (por medio de la prueba t).

Las células derivadas de JWE tienen un alto potencial proliferativo, que se mantiene durante al menos 9 pasajes en las condiciones de cultivo utilizadas (medio de crecimiento MBQDCM con un 5 % de LPh). En estas condiciones de cultivo, como se ha determinado experimentalmente con dos aislados independientes de células derivadas de JWE,
 35 las células derivadas de JWE alcanzarán la senescencia entre el pasaje 10 y el pasaje 12, como se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla: crecimiento de SVWJ de acuerdo con la invención

Pasaje	Aislamiento 1	Aislamiento 2	
1	5,89	4,99	
2	5,00	5,47	
3	5,04	4,76	
4	5-02	4,24	
5	4,58	5,03	Duplicaciones de población por pasaje
6	4,95	5,30	
7	5,40	4,69	
8	5,22	4,63	
9	4,92	4,54	
10	4,83	1,81	
11	4,58	n/a	

12	3,27	n/a	
Total	58,70	45,44	Duplicación acumulada de la población

Este ejemplo añade pruebas adicionales de que las condiciones de aislamiento y expansión de células derivadas de la Jalea de Wharton estromal (células derivadas de JWE) de acuerdo con la presente invención permiten generar grandes poblaciones celulares de células derivadas de JWE. Este Ejemplo también añade pruebas de que las células derivadas de JWE son diferentes de las derivadas de PVJW y tienen un mayor potencial proliferativo.

El alto potencial proliferativo y la duplicación de la población (DP) por pasaje aumentan el rendimiento del banco celular y/o reducen el tiempo de producción de un banco celular, respectivamente, en comparación con las CEM de referencia, como las células derivadas de PVJW. Esto es ventajoso desde el punto de vista industrial.

Ejemplo 10: Actividad de la telomerasa

Para este ensayo se alicuotaron 200.000-500.000 células estromales derivadas de Jalea de Wharton (JWE) tal como se describe en la presente memoria descriptiva en un tubo Eppendorf de 1mL y a continuación se centrifugaron a 1.200 rpm (Beckham Coulter Allegra™ 25R) durante 10 minutos a +4°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 1X SSAF. Tras una segunda etapa de centrifugado, los pellets secos se almacenaron a -80°C. Para realizar el ensayo, se utilizó el conjunto TeloTAGGG Telomerasa RCP ELISA PLUS (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la Fig. 10. Las muestras analizadas mostraron una media de 2,4±1,7 % de actividad telomerasa respecto al control positivo proporcionado por el conjunto (considerado como 100 %). Esto confirma que la mayor capacidad de proliferación de las células derivadas de JWE no está correlacionada con una actividad telomerasa anómalamente elevada.

Ejemplo 11: Senescencia

Material y procedimientos: Las células estromales derivadas de Jalea de Wharton (JWE) descritas en la presente memoria descriptiva tras tripsinización (para el origen celular véanse los Ejemplos 1 y 2A; para los pasajes, véanse los Ejemplos 2B y 2C) tras el pasaje 6 (P6), el pasaje 8 (P8) o el pasaje 11 (P11), el pasaje 12 (P12), se sembraron en seis placas de pocillos múltiples a una densidad de 3.000 células/cm² en 3 ml de medio de cultivo (MEMD con un 5 % de LPH o MBQDCM con un 5 % de LPH) y se cultivaron durante 4-5 días a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂ y un 95 % de humedad, por triplicado a menos que se especifique lo contrario. A continuación, las células se lavaron en solución salina amortiguada con fosfato 1X (SSAF) y se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en formaldehído al 2 %/0,2 % de glutaraldehído. La placa de cultivo se enjuagó dos veces en SSAF 1X y se añadió 1 mL de solución de tinción β-Gal fresca (1 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-βD-galactósido/100 μL de dimetilformamida, 40 mM de ácido cítrico/fosfato sódico, pH 6.0, 5 mM de ferrocianuro potásico, 5 mM de ferricianuro potásico, 150 mM de NaCl y 2 mM de MgCl₂ · 0,5 mM de ferrocianuro potásico, 5 mM de ferricianuro potásico, 150 mM de NaCl y 2 mM de MgCl₂) (utilizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y el color se reveló con la luz de un microscopio invertido, tal como se describe en las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Cell Signaling Technology). Las células teñidas positivamente presentaban un color azul verdoso en el citoplasma. Las muestras teñidas se lavaron en SSAF 1X y se visualizaron con un objetivo 2,5X mediante el uso de un microscopio invertido (Zeiss). Las células teñidas positivas (por campo) fueron cuantificadas por un observador y se examinaron al menos 8 campos de visión para cada donante (a menos que se especifique lo contrario).

Resultados: En los primeros pasajes de cultivo (P6-P8), sólo unas pocas células fueron débilmente positivas para la tinción con β-galactosidasa (datos no mostrados), lo que indica que, incluso con una densidad de siembra muy baja, las células derivadas de JWE, tal como se describen en la presente memoria descriptiva, tienen tendencia a ser marginalmente senescentes. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, es posible que el lisado de plaquetas contenga suplementos que sean ventajosos para el crecimiento de las células *ex vivo*, por ejemplo, factores de crecimiento.

Ejemplo 12: Potencial de diferenciación osteogénica

Descripción del procedimiento: Se indujo a los JWE en el pasaje 5 (Ejemplo 2C) a diferenciarse hacia el linaje osteogénico. Brevemente, se sembraron JWE a una densidad de 10.000 células/cm² en MBQDCM con un 5 % de LPH en placas de 6 pocillos múltiples (6-PM). Estas placas 6-PM se recubrieron previamente con una solución de Jalea al 0,1 %. Tras 3-4 días de equilibrio, se cambió el medio de mantenimiento y se sustituyó por medio osteogénico. El medio osteogénico estaba compuesto por MBQDCM con un 5 % de LPH, suplementado con 10 mM de beta-glicerofosfato, 0,1 mM de ácido ascórbico-2-fosfato y 10 nM de dexametasona, además de 100 ng/mL de rhBMP-2 (proteína morfogénica ósea 2) a partir del 7º día de inducción. La confirmación de la diferenciación osteogénica se realizó por medio de la tinción de von Kossa (de forma que la matriz ósea se marca en oscuro) combinada con el análisis qRCP en tiempo real (descrito más adelante).

Después de 2 semanas, los cultivos en medio osteogénico (cf. arriba) y los cultivos de control en paralelo (crecidos en paralelo en MBQDCM más 5 % LPH, es decir, un medio que no induce la osteogénesis) fueron fijados y teñidos para identificar los depósitos de calcio orgánico. Para la tinción de von Kossa, las muestras se fijaron en metanol helado

durante 2 minutos, se enjuagaron dos veces en agua destilada y se incubaron bajo una lámpara ultravioleta (UV) con nitrato de plata en agua durante 30 minutos. Tras otros dos lavados en agua destilada, se observaron 10 campos de alta potencia con un aumento de 10X (microscopio Axioskop-Observer-1invertido; Zeiss). Las imágenes grabadas digitalmente se analizaron por medio del programa informático ImageJ (National Institute of Health, EE.UU.) cuantificando selectivamente las zonas oscuras teñidas positivamente de depósitos de calcio orgánico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados: Los resultados se muestran en la Fig. 12. Como se muestra, tras 14 días de tratamiento con medio osteogénico, la morfología de las muestras de control era diferente de la de las muestras inducidas con medio osteogénico, y la tinción de von Kossa del fosfato cálcico proporcionaba una tinción negra positiva (Fig. 12A). La diferencia entre las áreas teñidas positivas en las muestras control e inducidas fueron estadísticamente significativas (por medio de la prueba T) (Fig. 12B). Para confirmar aún más la firma osteogénica, se realizaron análisis moleculares por medio de TiempoReal-RCP (Fig. 12C). El nivel de expresión relativa del gen biomarcador osteogénico se normalizó con respecto al gen de referencia endógeno beta actina. El ARNm de inducción plegada se calculó basándose en la condición de cultivo estándar de JWE (MBQDCM más 5 % LPh), definida como células no inducidas y subconfluentes. Todos los genes analizados están significativamente regulados al alza con respecto a las condiciones de cultivo estándar ($p \leq 0,05$, por medio de la prueba T). Los inventores observaron que la fosfatasa alcalina (FA) y determinadas proteínas de la matriz, como el biglicano (BGN), el colágeno (COL1A1), la decorina (DCN) y la elastina (ELN) eran los biomarcadores más regulados al alza. Una combinación de estos marcadores es característica del linaje osteogénico (Murgia et al., PLoS One. 2016, vol. 11: e0163629). Este perfil de expresión confirma un compromiso osteogénico inicial de las células.

Ejemplo 13: Potencial de diferenciación adipogénica

Descripción del procedimiento: Para la diferenciación adipogénica, las células JWE (Ejemplos 1, 2A, 2B, 2C) en el pasaje de cultivo 5 se sembraron a 10.000 células/cm² en MBQDCM con un 5 % de LPh en placas de 6 pocillos múltiples (6-PM) y, después de 3 días, el medio se sustituyó por un medio de inducción adipogénica. El medio adipogénico estaba compuesto de MBQDCM con un 5 % de LPh, suplementado con 1 μ M de dexametasona, 60 μ M de indometacina, 10 μ M de insulina, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 10 % de suero de conejo, 5 % de suero de caballo, 1 % de L-glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina. Las células de control se cultivaron con MBQDCM con un 5 % de LPh. Las células se sembraron en duplicados técnicos para cada condición.

Después de 10 días las células se tiñeron con la tinción Oil Red O (una tinción comercialmente disponible para adipocitos) para confirmar la diferenciación, de la siguiente manera: las células se lavaron brevemente con SSAF 1x, se fijaron con vapores de formaldehído al 37 % durante 10 minutos y a continuación se lavaron con agua durante 2 minutos. La tinción se obtuvo añadiendo una solución de Oil Red O (10mg/mL de Oil Red O en etanol al 70 % y acetona) durante 3 minutos en los pocillos. Las células se teñían con Hematoxilina Harris (Bio-Optica, Milán, Italia) durante 3 minutos. Tras el tratamiento, las células diferenciadas y los controles se visualizaron por medio de observaciones microscópicas (Axio Observer A1 con cámara en color AxioCam MRC5 y software Axiovision 4.82; todos Zeiss).

Los resultados se muestran en la Fig. 13. Las células JWE, tras 10 días de tratamiento, fueron capaces de producir gotas redondas de lípidos en su interior, lo que confirma el compromiso adiposo. Las vacuolas lipídicas se detectaron en gran medida en las muestras inducidas, pero no en los controles no inducidos (Fig. 13).

Ejemplo 14: Potencial de diferenciación condrogénica

Descripción del procedimiento: Para la diferenciación condrogénica, se alicuotaron 200.000-500.000 JWE (Ejemplos 1, 2A, 2B, 2C) en el pasaje de cultivo P5 en un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 1.200 rpm (Beckham Coulter Allegra™ 25R) durante 10 minutos. Las células se mantuvieron en el pellet en medio de crecimiento a 37 °C con el capuchón abierto. Tras 2 días de incubación, el medio de crecimiento se sustituyó por el medio de inducción, compuesto por MBQDCM con un 5 % de lisado de plaquetas humanas (LPh), suplementado con: 500 ng/mL rhBMP-6, 10 ng/mL factor de crecimiento transformante- β , 50 mg/mL ITS+Premix (que contiene insulina 6,25 μ g/mL, transferrina 6,25 μ g/mL, ácido selénico 6,25 ng/mL, BSA 1,25 mg/mL y ácido linoleico 5,35 μ g/mL), 100 nM de dexametasona, 0,2 mM de ácido-2-fosfato L-ascórbico, 100 μ g/mL de piruvato sódico, 40 μ g/mL de prolina. El medio se cambiaba cada tres días. Antes y después de cada intercambio de medio, los tubos se centrifugaron a 1.200 rpm durante 10 minutos, como se ha descrito anteriormente. Durante el período de incubación, las células permanecen en forma de pellet con los capuchones del tubo abiertos. La inducción duró 21 días, y los especímenes se fijaron durante 1 hora en formaldehído al 10 % y a continuación se deshidrataron por medio de pasajes seriados en etanol a concentraciones crecientes, del 70 % (v/v) al 100 %. A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron en rodajas en portaobjetos de microscopio para la tinción con azul Alcian. Los portaobjetos se desparafinaron con el agente de limpieza Histo-C y se rehidrataron por medio de pasajes en una escalera alcohólica de concentración decreciente (del 100 % de etanol al 70 % de etanol) (v/v). A continuación, las secciones de muestra se incubaron con una hialuronidasa de 0,5 mg/mL en solución amortiguadora de fosfato (8 g/L NaCl, 2 g/L NaH₂PO₄ y 0,3 g/L NaH₂PO₄) con 10 mg/mL de BSA. Los portaobjetos se lavaron en agua durante 5 minutos y a continuación se sumergieron en una solución de ácido acético al 3 % (v/v) durante unos segundos. Las secciones se tiñeron con una solución de 10 mg/mL de azul Alcian (un colorante comercial) en ácido acético al 3 % (pH 2,5), permanecieron allí 30

minutos y, tras una etapa de lavado en agua, se contratintaron durante 5 minutos con una solución nuclear de rojo rápido (un colorante comercial).

Los resultados se muestran en la Fig. 14. La JWE, tras 21 días de tratamiento, había desarrollado una morfología rica en matriz multicapa. La JWE inducida mostró una menor celularidad y los glicosaminoglicanos dentro de la matriz extracelular. El JWE de control mostró una elevada celularidad y un escaso componente de matriz.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Sección transversal del cordón umbilical (humano) y vista esquemática de secciones (zonas anatómicas) del cordón umbilical (humano). Las dos formas elípticas sombreadas en gris en el exterior (1a y 1b) forman juntas la membrana de revestimiento del cordón umbilical (que comprende dos capas: 1a (dibujada como un círculo gris oscuro en la parte exterior), la capa amniótica (o epitelial), también denominada membrana de revestimiento del cordón umbilical; y 1b (dibujada como un círculo gris claro en la parte interior): la capa subamniótica (o mesenquimatosas); 2: la vena umbilical; 3: arterias umbilicales; 4: zona intervascular; 5: zona perivascular (en gris); 6: ejemplo ilustrativo de la localización de la Jalea de Wharton; 7: sangre del cordón umbilical (en el lumen del vaso). A menos que se indique explícitamente lo contrario, el estroma subamniótico (1b) está incluido en el "estroma" al que se hace referencia en la presente memoria descriptiva. A menos que se indique explícitamente lo contrario, la Jalea de Wharton subamniótica) está incluida en la Jalea de Wharton denominada "Jalea de Wharton estromal" en la presente memoria descriptiva.

Fig. 2: Caracterización inmunohistoquímica de distintas zonas del cordón umbilical humano. JW: Jalea de Wharton; PM: pared multicapa; PV: perivascular; V: vaso; L: lumen. JW estromal: JW al menos a 3 mm de distancia de la pared externa de los vasos del cordón, e interna del epitelio amniótico. [↔] : Área perivascular de unos 2,00 mm incluyendo JW+pericito+células endoteliales. Materiales y procedimientos: Se fijó en formol una muestra de cordón umbilical humano y se incrustó en parafina. Se aislaron las secciones y se cortaron en cortes de 5 µm para su posterior tinción. Se aprecia la tinción diferenciada en las distintas zonas que representan la Jalea de Wharton estromal y la zona perivascular. La zona perivascular presenta un patrón histo-morfológico más complejo con vasos (V), células perivasculares (PV) bordeando las zonas JW. La complejidad también está relacionada con los diferentes tipos celulares representados en la región perivascular. Por el contrario, la Jalea de Wharton estromal aparece histológicamente como una zona relativamente más uniforme con elementos celulares más homogéneos dispersos en la matriz del tejido estromal. Las células aisladas expresan marcadores que suelen encontrarse en las poblaciones de CEM *ex vivo*, como CD10, CD140b, GD2, CD73 (no mostrados en esta Figura). El patrón de tinción inmunohistoquímica para estos marcadores también difiere entre las dos regiones. En la figura 2B, las diferencias histológicas son más evidentes entre la zona de los vasos del cordón y el estroma de la Jalea de Wharton. En los vasos (V) se aprecian claramente el lumen (L) y las células (flechas) que representan la capa endotelial (CD31) y la capa subendotelial (CD146, CD271, GD2). CD140b también se expresa en la parte endoluminal del vaso. La tinción positiva para CD73 se encuentra en la capa subendotelial, con una intensidad que aumenta mientras se avanza hacia la matriz de la Jalea de Wharton (Rasini et al., 2013, *Cytotherapy*, vol. 15, p. 292-306).

Fig. 3: Disección (seccionamiento) y extracción de células - para más detalles, véase el Ejemplo 1.

Fig. 4: Resultados del Ejemplo 4, evidenciando que el procedimiento de la invención es causante de una viabilidad significativamente mayor. Para más detalles, véase el ejemplo 4. * PVJW: Células obtenidas de acuerdo con un procedimiento convencional, véanse los Ejemplos comparativos. JWE: células aisladas de acuerdo con la presente invención.

A: Células apoptóticas: efecto del lisado de plaquetas y comparación con un procedimiento convencional. En cuanto al número de células recién aisladas, los inventores obtuvieron más células (PVJW) del protocolo de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1, ($4,15 \pm 1,28 \times 10^6$) que del protocolo de acuerdo con la presente invención ($1,49 \pm 0,35 \times 10^6$). El gráfico representa la media y el error estándar de la media (EEM) de células apoptóticas en tres digestiones (n=3). El 6 % \pm 9,6 % del total de células derivadas de PVJW aisladas de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 fueron positivas para 7AAD (Fig. 4A, barra sombreada superior a la derecha). Por el contrario, el porcentaje de células derivadas de JWE positivas para 7AAD, tanto en presencia como en ausencia de LPh, es mucho menor. De este modo, los inventores han descubierto que las células obtenidas de acuerdo con la presente invención tienen un mayor grado de viabilidad que las células obtenidas por un procedimiento de acuerdo con el estado de la técnica.

B: Análisis CCAF de muestras celulares recién aisladas. Los 4 gráficos CCAF representan parámetros físicos (derecha) y la positividad 7AAD (es decir, apoptosis, a la izquierda) de células derivadas de JWE (arriba) células derivadas de PVJW (abajo), respectivamente. En los gráficos de la derecha, las células vivas se encuentran a la izquierda de la línea vertical.

C: Representación gráfica del número total de células, determinado por citometría de flujo (Fig. 4B). El gráfico representa la media y el error estándar de la media (EEM) de células apoptóticas en tres digestiones (n=3 para ambas poblaciones celulares).

D: Representación gráfica del porcentaje de células apoptóticas, determinado por citometría de flujo (Fig. 4B). El análisis CCAF de muestras recién aisladas reveló para las células derivadas de JWE, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, una viabilidad superior al 79 % de la población celular total. Por el contrario, el 52,9% \pm 2,6% del total de células aisladas de acuerdo con el Ejemplo comparativo 1 (células derivadas de PVJW) fueron positivas para 7AAD. **C:** eficacia del aislamiento celular en muestras JWE (n=5) y PVJW (n=9) **D:** El gráfico representa la media y el error estándar de la media (EEM) de células apoptóticas en tres digestiones (n=3 para ambas poblaciones celulares).

Fig. 5: Morfología y formación de colonias

A: Se representan los parámetros físicos determinados por citometría de flujo, es decir, la dispersión frontal (LDHA) y la dispersión lateral (CSE) de células recién aisladas de un cordón umbilical (gráfico CCAF a la izquierda). El gráfico representa la media y el EEM de los parámetros físicos. La población celular aislada derivada de JWE (de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2A) se caracteriza por valores de LDHA significativamente más pequeños que la población celular aislada derivada de PVJW (de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 y 2A; $p=0,02$ por T-Test). CSE: Las células derivadas de JWE presentan una menor complejidad citoplasmática que las células procedentes de PVJW. Para más detalles, véase el ejemplo 4A.

B: Estudios morfológicos en el pasaje de cultivo 1 (n=3). Tras la expansión, las células derivadas de JWE (Ejemplo 2C) se caracterizaron por una población celular pequeña y de forma fusiforme, en cambio las células derivadas de PVJW (de acuerdo con el Comparativo 2C) se caracterizaron por una forma grande y un citoesqueleto prominente. Las dos imágenes representan la morfología de las células derivadas de JWE (izquierda) frente a las derivadas de PVJW (derecha) dos o tres días después de la siembra en el pasaje de cultivo 1 (P1) en una muestra representativa (aumento original 100X).

C: Formación de colonias de células derivadas de JWE y PVJW. Para más detalles, véase el ejemplo 4C. Las células se tiñeron con violeta cristal antes de tomar la fotografía que se muestra en la parte inferior. Los cultivos de poblaciones celulares derivadas de JWE se caracterizan por estar formados por células con una superficie pequeña; estas células tienden a formar colonias, mientras que los cultivos de poblaciones celulares derivadas de PVJW se caracterizan por estar formados por células con diferentes superficies, incluyendo también células grandes. De este modo, las células derivadas de PVJW parecen más homogéneas; homogéneo en este contexto significa que sustancialmente todas las células parecen muy parecidas o similares. Las células derivadas de PVJW de mayor tamaño tienden a crecer relativamente más despacio (datos no mostrados).

Fig. 6: Determinación cuantitativa de la superficie celular: Células derivadas de JWE frente a células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea (MO, o MO-CEM). Las CEMs adherentes a plástico procedentes de médula ósea y de Jalea de Wharton estromal (MO y JWE respectivamente) se visualizaron en el pasaje de cultivo 5 (P5). Se adquirieron cinco imágenes de cada muestra y se identificaron ópticamente 34 células MO-CEM y 33 células JWE. Las células se rodearon gráficamente de forma manual tras una inspección visual. Las células derivadas de la MO se caracterizaban por una mayor superficie celular media ($4300,5 \pm 2486,5 \mu\text{m}^2$) en comparación con las células derivadas de la JWE ($1701,2 \pm 1137,3 \mu\text{m}^2$) ($p = 5,15 \times 10^{-7}$, por medio de ANOVA). De este modo pues, se llegó a la conclusión de que las CEMs derivadas de JWE descritas en la presente memoria descriptiva son más pequeñas que las CEMs derivadas de MO.

Fig. 7: Resultados del ejemplo 7. El gráfico de la izquierda representa la media y el EEM de los marcadores de superficie en células derivadas de PVJW y células derivadas de JWE, ambas recién aisladas de tres cordones umbilicales por los dos procedimientos de aislamiento diferentes (JWE: de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2A; PVJW: de acuerdo con los Ejemplos comparativos 1 y 2A). El análisis inmunofenotípico de las muestras recién aisladas reveló para ambos procedimientos la presencia de CD105, CD73 y CD90, los antígenos de superficie típicos de las CEMs. Del mismo modo, se detectó la visualización del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (CD140b) con ambos procedimientos. El ALH-DR no se expresaba en ambas muestras. Sin embargo, la visualización de 3G5 sólo se detectó en la población de células derivadas de PVJW, lo que indica que el procedimiento de la presente invención es específicamente adecuado para el aislamiento de una población de CEM derivadas de JWE, que no comprende células perivasculares.

A: El gráfico de la izquierda representa la media y el EEM de los marcadores de superficie en PVJW y SPPC recién aislados de tres cordones umbilicales tratados por los dos procedimientos de digestión diferentes (Ejemplo comparativo 1, "PVJW" frente a células como las descritas en la presente memoria descriptiva, JWE). El panel de la derecha indica algunos marcadores de superficie que se expresan/no se expresan en la mayoría de las células.

B: El gráfico representa el porcentaje medio de células que muestran marcadores de superficie específicos, en células recién aisladas de cordones umbilicales por dos procedimientos diferentes (Ejemplo comparativo 1, "PVJW" frente a células como las descritas en la presente memoria descriptiva, JWE).

- 5 **Fig. 8:** Expresión génica cuantitativa de las células de acuerdo con la presente invención, determinada por RCP en tiempo real (RT-RCP). Dos poblaciones celulares independientes aisladas de acuerdo con la presente invención fueron sometidas a análisis RT-RCP; ambas se muestran en la Fig. 8 y se comparan con las células PVJW de control. El gráfico muestra la diferencia de expresión (Delta Ct) entre 2 genes (gen de interés frente a beta-actina, un gen de mantenimiento). La expresión de APCDD1 no se detectó en las células de control.
- 10 **Fig. 9:** Potencial proliferativo: El gráfico representa la media y el EEM (error estándar de la media) de las duplicaciones acumulativas de la población de células derivadas de PVJW (n=9) y células derivadas de JWE (n=7) en los cuatro pasajes de cultivo analizados (de P1 a P4). Se observa un mayor número de doblajes de población (DP) por pasaje en las células derivadas de JWE, en comparación con las células derivadas de PVJW. Para más detalles, véase el ejemplo 9.
- 15 **Fig. 10:** Expresión de telomerasa en diferentes lotes de células derivadas de JWE. Para más detalles, véase el ejemplo 10.
- 20 **Fig. 11:** Senescencia en diferentes lotes de células derivadas de JWE. CAKE2 es el acrónimo de un medio basal sustancialmente equivalente a MBQDCM; 5PL es el acrónimo de 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas. Para más detalles, véase el ejemplo 11.
- 25 **Fig. 12:** Potencial osteogénico de las poblaciones celulares derivadas de la JW. La interrupción de las barras indica un cambio de escala. CAKE2 es el acrónimo de un medio basal sustancialmente equivalente a MBQDCM; 5PL es el acrónimo de 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas. Para más detalles, véase el ejemplo 12.
- 30 **Fig. 13:** Potencial adipogénico de las poblaciones celulares derivadas de JW. Para más detalles, véase el ejemplo 13. Las células derivadas de JWE produjeron gotas redondas de lípidos en el interior de las células (panel superior e inferior de la derecha), lo que confirma el compromiso adiposo. Las vacuolas lipídicas se detectaron en gran medida en las muestras inducidas, mientras que estaban ausentes en los controles no inducidos. CAKE2 es el acrónimo de un medio basal sustancialmente equivalente a MBQDCM; 5PL es el acrónimo de 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas.
- Fig. 14:** Diferenciación condrogénica de poblaciones celulares derivadas de JWE. Para más detalles, véase el ejemplo 14. Tras 21 días de tratamiento, las células derivadas de JWE no inducidas (control) habían desarrollado una morfología rica en matriz multicapa (dos paneles de la izquierda). Las células derivadas de JWE inducidas (dos paneles de la derecha) mostraban una menor celularidad, y los glicosaminoglicanos dentro de la matriz extracelular (zonas de color oscuro, correspondientes a una fuerte tinción azul en la imagen coloreada original). CAKE2 es el acrónimo de un medio basal sustancialmente equivalente a MBQDCM; 5PL es el acrónimo de 5 % (vol./vol.) de lisado de plaquetas humanas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento ex vivo para obtener una célula estromal mesenquimal, el procedimiento comprende
 - (a) aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma de un cordón umbilical, donde la Jalea de Wharton estromal es la Jalea de Wharton del cordón umbilical que excluye la zona perivascular;
 - 5 (b) someter la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma a un tratamiento enzimático que comprenda la enzima colagenasa en presencia de lisado de plaquetas (LP), liberando de este modo al menos una célula de la Jalea de Wharton estromal o fracción de la misma; en la que la etapa b) va seguida de una etapa c): (c) expandir dicha al menos una célula en un medio de crecimiento que comprenda lisado de plaquetas (LP).
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que (a) el aislamiento de la Jalea de Wharton estromal o de una fracción de la misma se **caracteriza por** una etapa de extracción física de los vasos y de la zona perivascular del cordón umbilical.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la eliminación física de los vasos y el área perivascular se **caracteriza por** despojar los vasos y el área perivascular del cordón umbilical.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que (a) aislar la Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma se **caracteriza** adicionalmente **por** una etapa de separar físicamente el estroma subamniótico de la membrana de revestimiento del cordón umbilical, como por ejemplo separando la Jalea de Wharton de la membrana de revestimiento del cordón umbilical, en particular al menos de la capa epitelial de la membrana de revestimiento del cordón umbilical.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la separación física de la Jalea de Wharton de la membrana de revestimiento del cordón umbilical se **caracteriza por** raspar la Jalea de Wharton, preferentemente sin diseccionar mecánicamente la membrana de revestimiento del cordón umbilical.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el cordón umbilical se segmenta antes de dicha etapa de eliminación física de los vasos y de la zona perivascular.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la segmentación es perpendicular al cordón, y en el que cada segmento perpendicular tiene preferentemente una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm, preferentemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 cm, y más preferentemente de aproximadamente 2,5 cm.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que segmento(s) de vasos se retiran del segmento(s) del cordón umbilical antes de la etapa (b).
- 30 9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tratamiento enzimático se realiza mezclando Jalea de Wharton estromal o una fracción de la misma con un Amortiguador de Digestión que comprende colagenasa, preferentemente a una actividad específica no superior a 0,5 Wünsch U/ml, más preferentemente no superior a 0,25 Wünsch U/ml, y específicamente 0,18 Wünsch U/ml.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las etapas (a) y (b) juntas se realizan en un tiempo total inferior a 3 horas o el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que en la etapa (b) el lisado de plaquetas es lisado de plaquetas humanas (LPh).
- 40 11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa (c) la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que comprende lisado de plaquetas humanas (LPh).
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
 - la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que no comprende ningún suero añadido, en particular ningún suero fetal bovino (SFB); o bien
 - la al menos una célula se expande en un medio de crecimiento que comprende el medio basal MBQDCM.

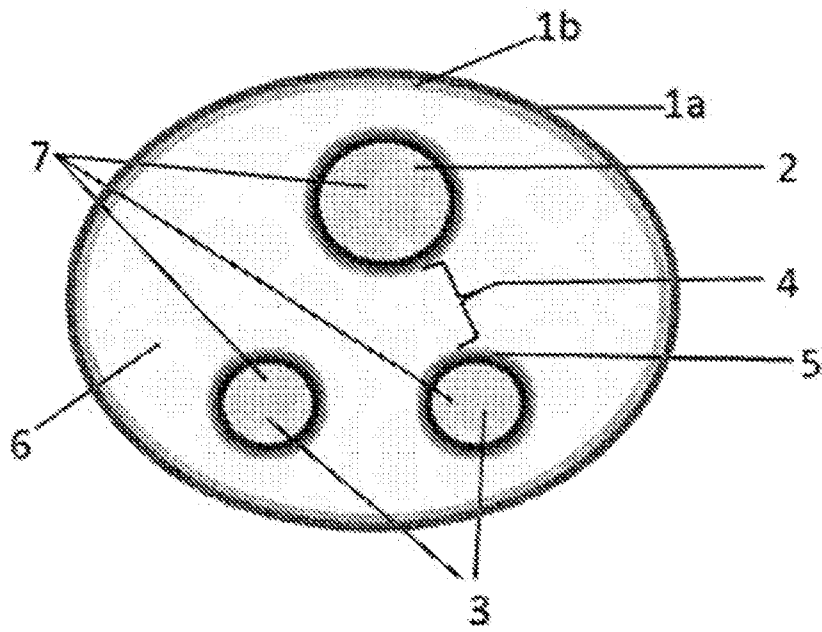


Fig. 1

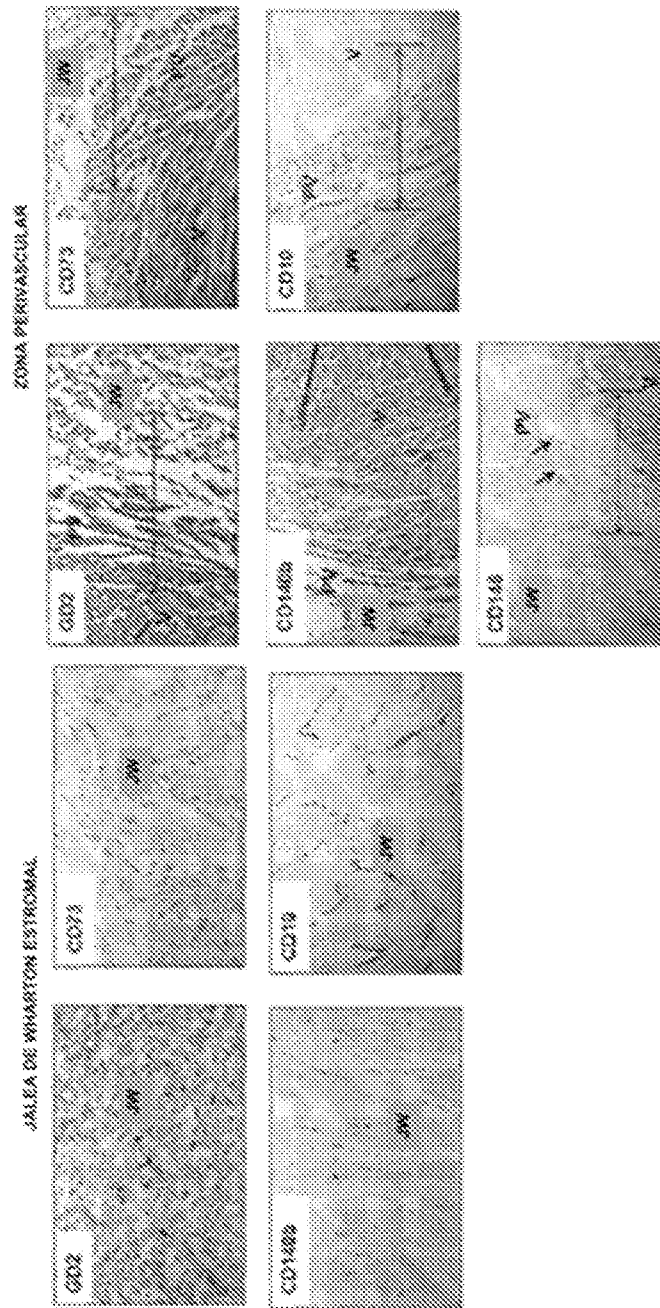
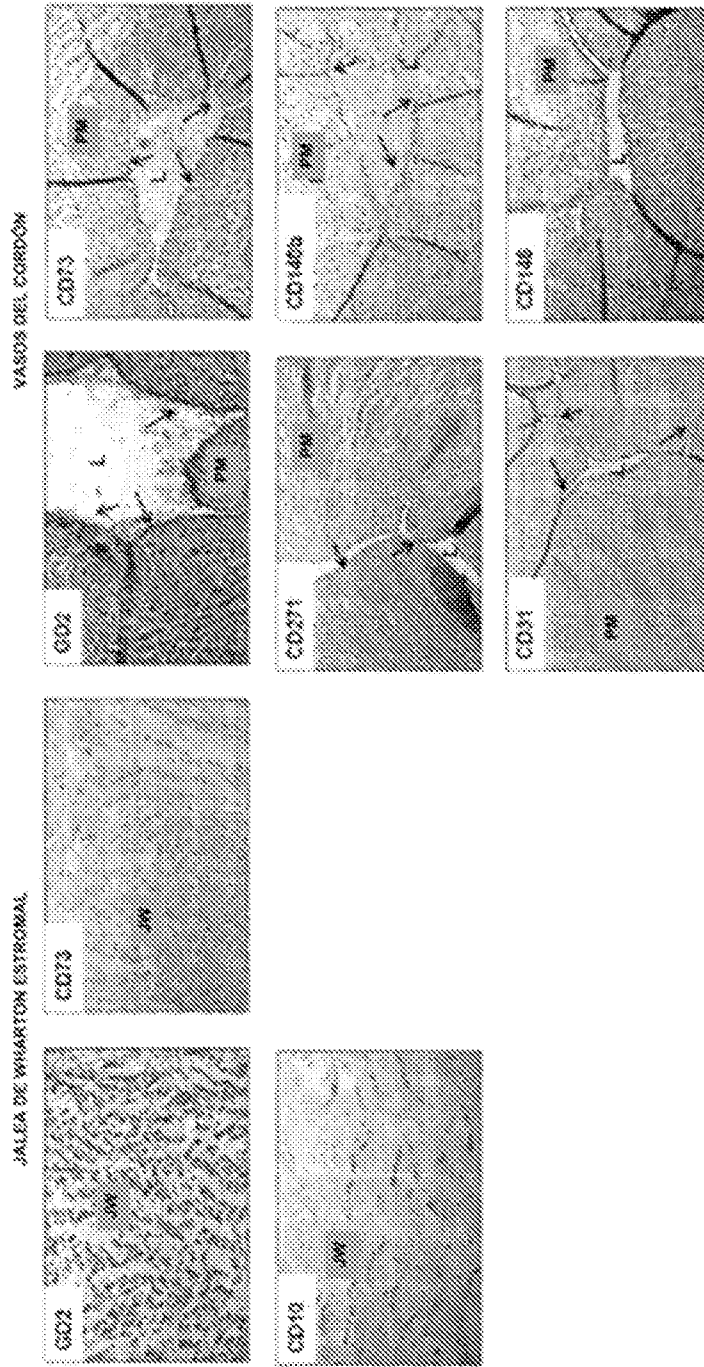
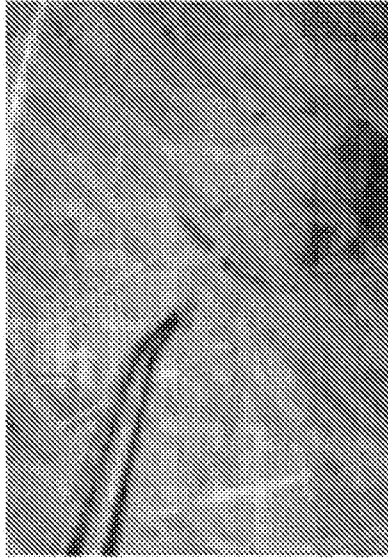


FIG. 2A

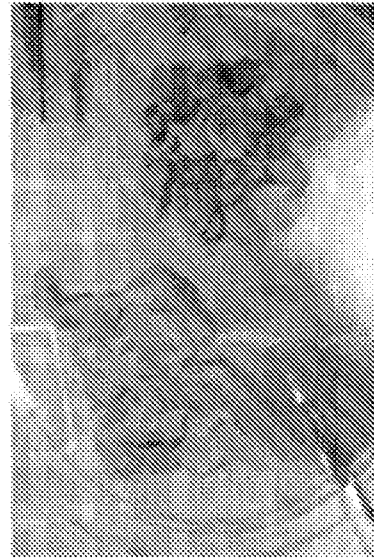




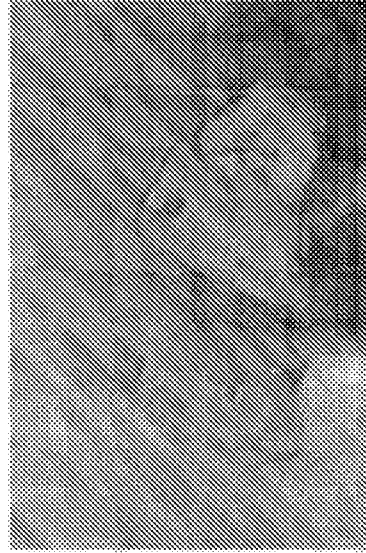
1. ACEPTAR CORDÓN



2. SEGMENTAR EL CORDÓN Y REMOVER LA ARTERIA UMBILICAL



3. CUIDADOSAMENTE REMOVER LA VENA UMBILICAL



4. JWE LISTA PARA SER PICADA PARA LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

T
9 0

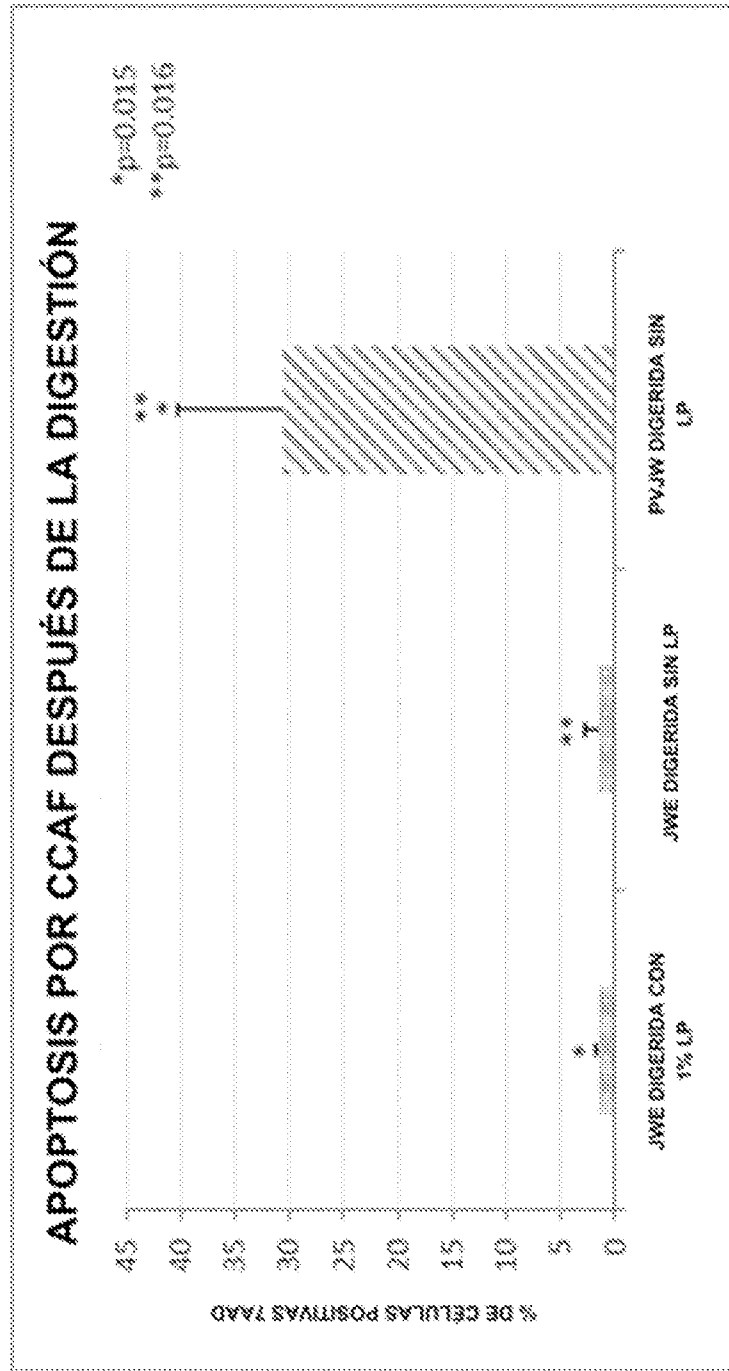


Fig. 4A

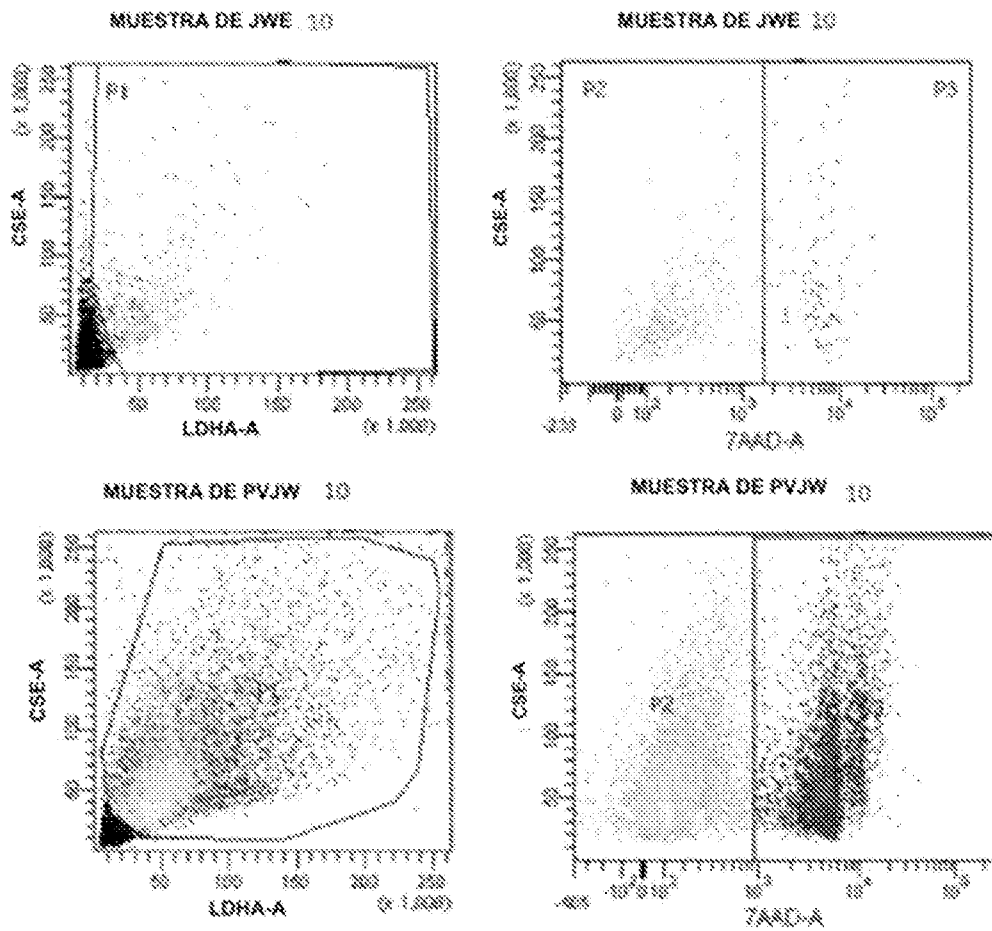


FIG. 4B

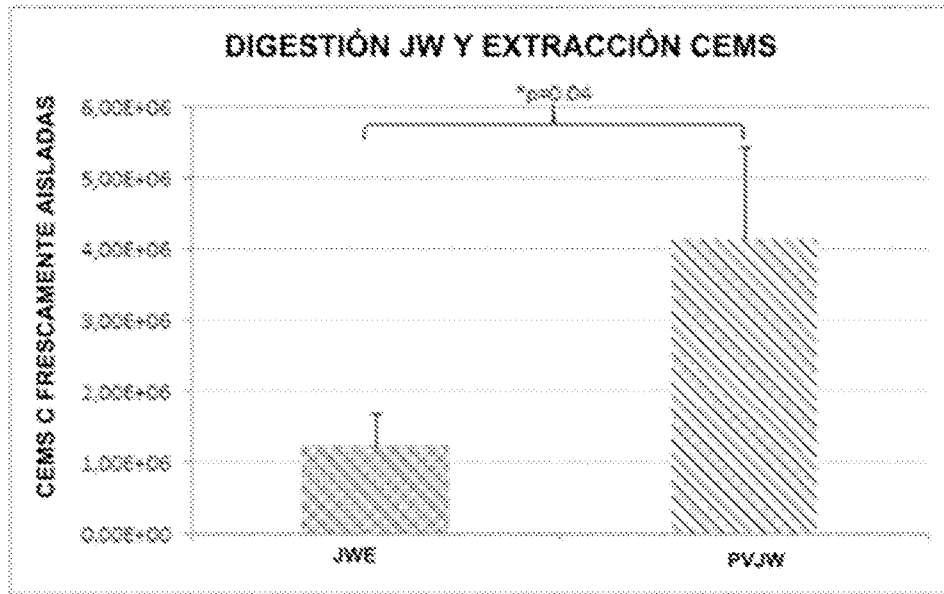


Fig. 4C

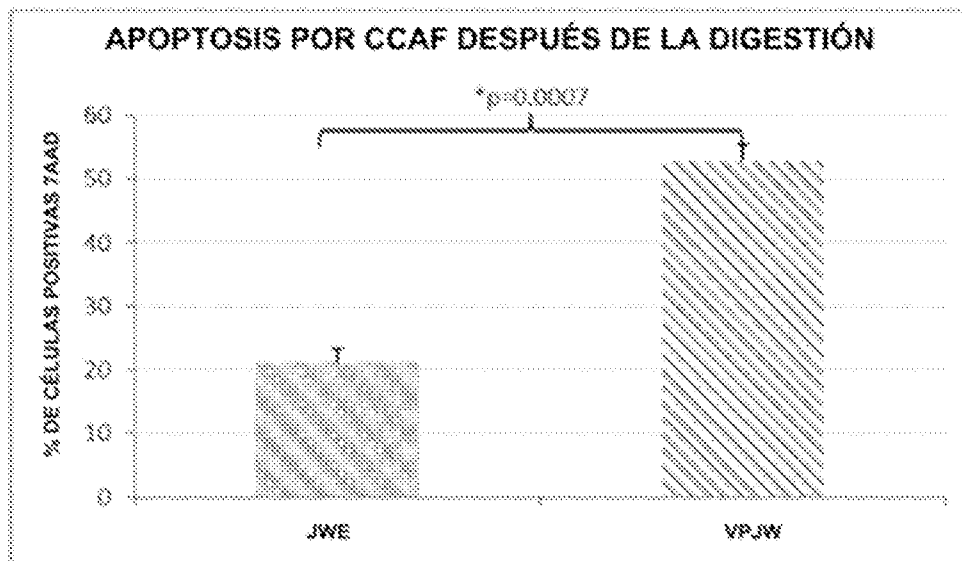


Fig. 4D

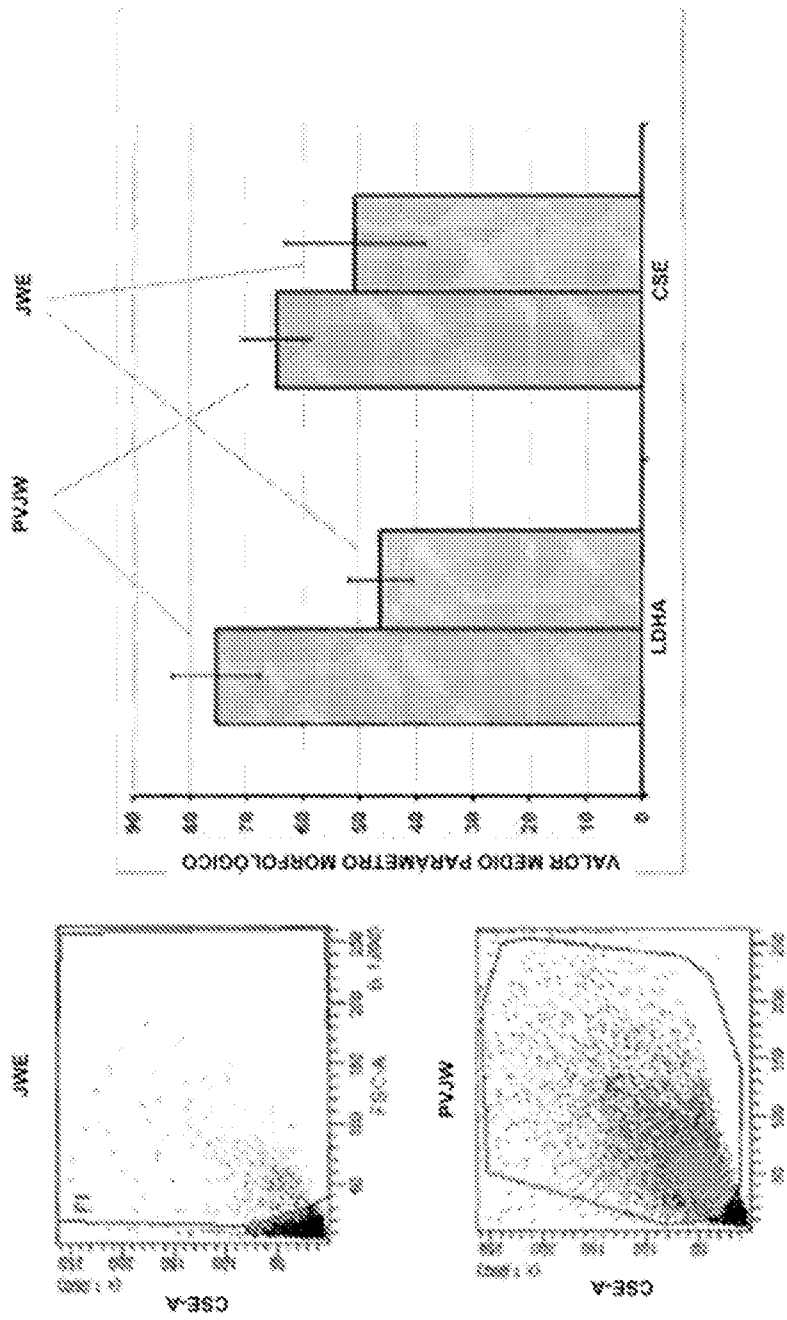


Fig. 5A

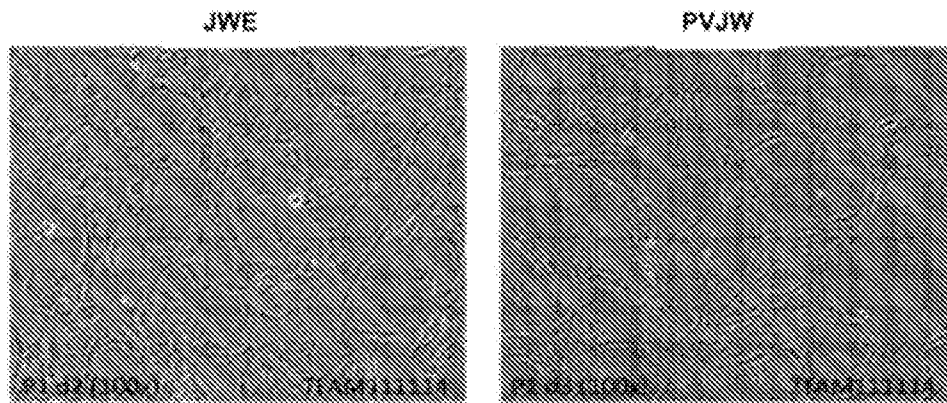


Fig. 5B

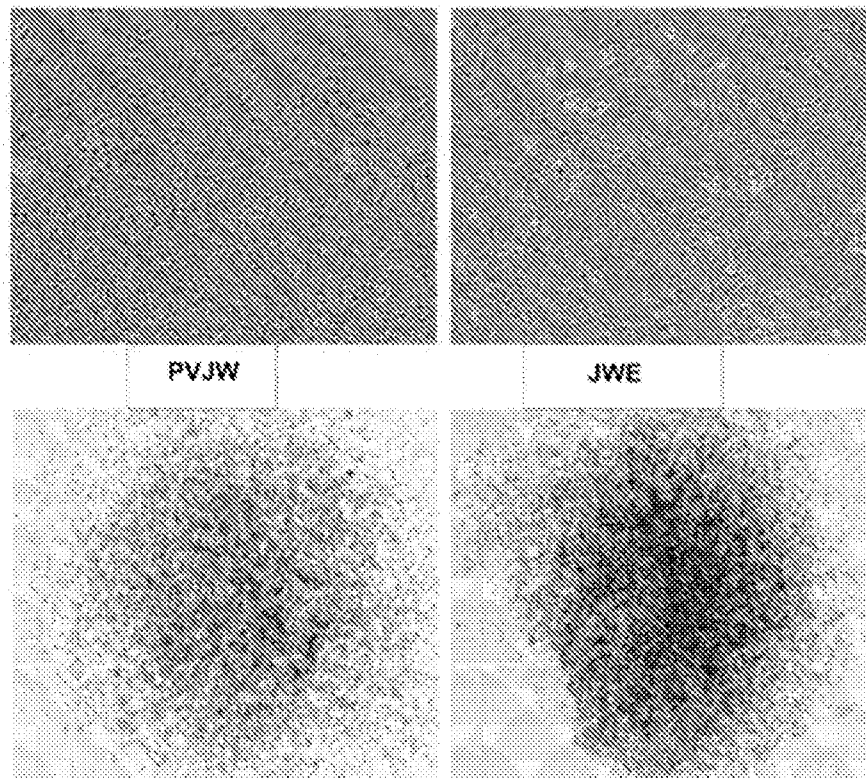
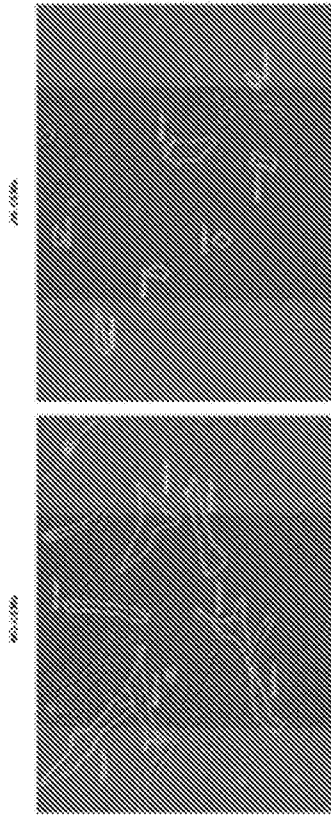
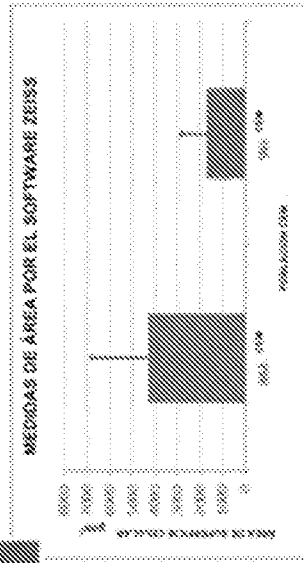


Fig. 5C



71
63
60



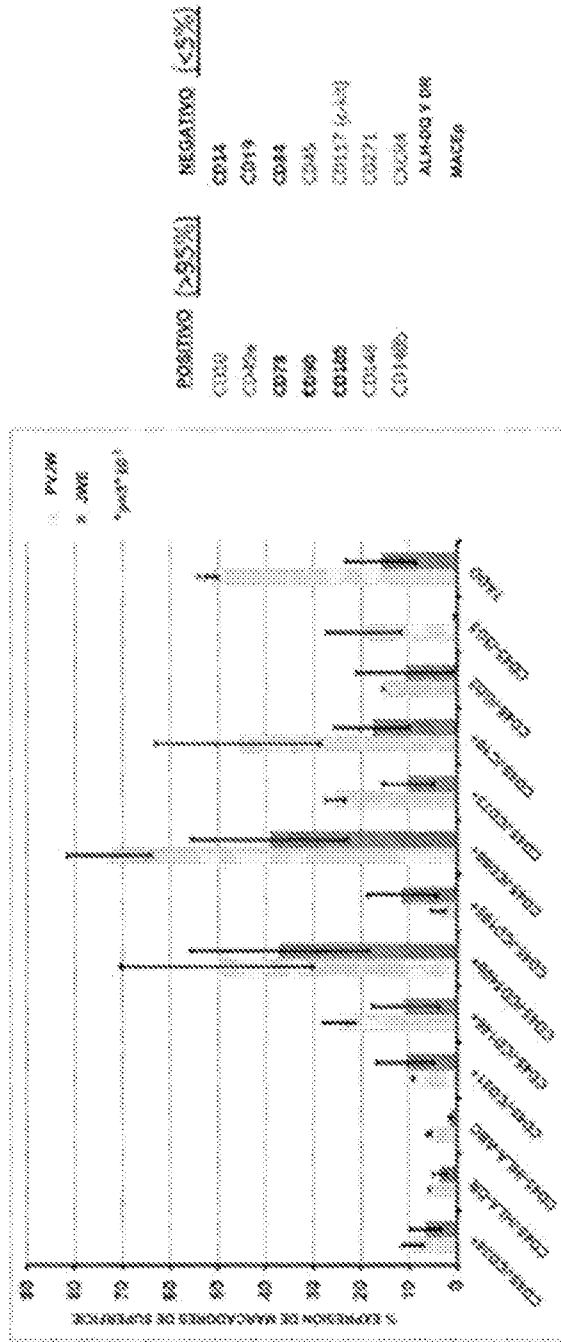


Fig. 7A

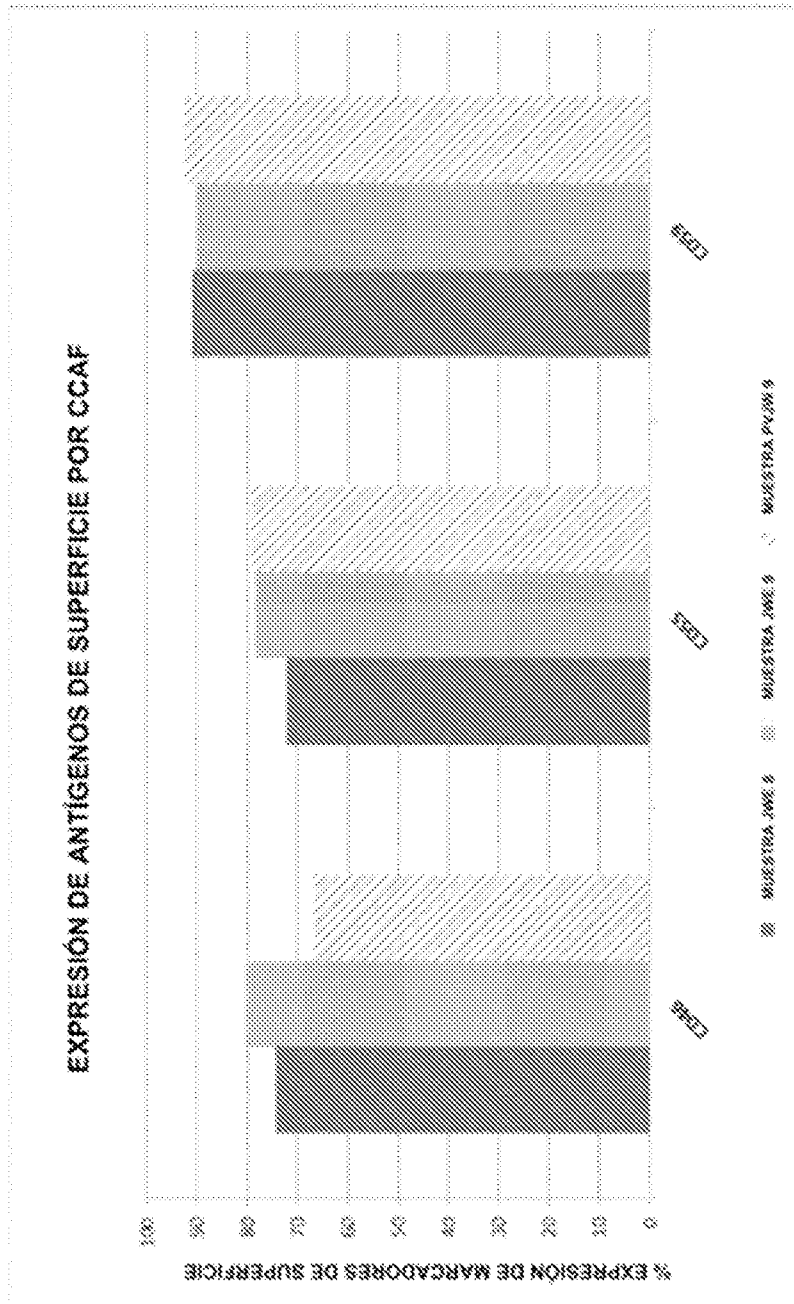


Fig. 7B

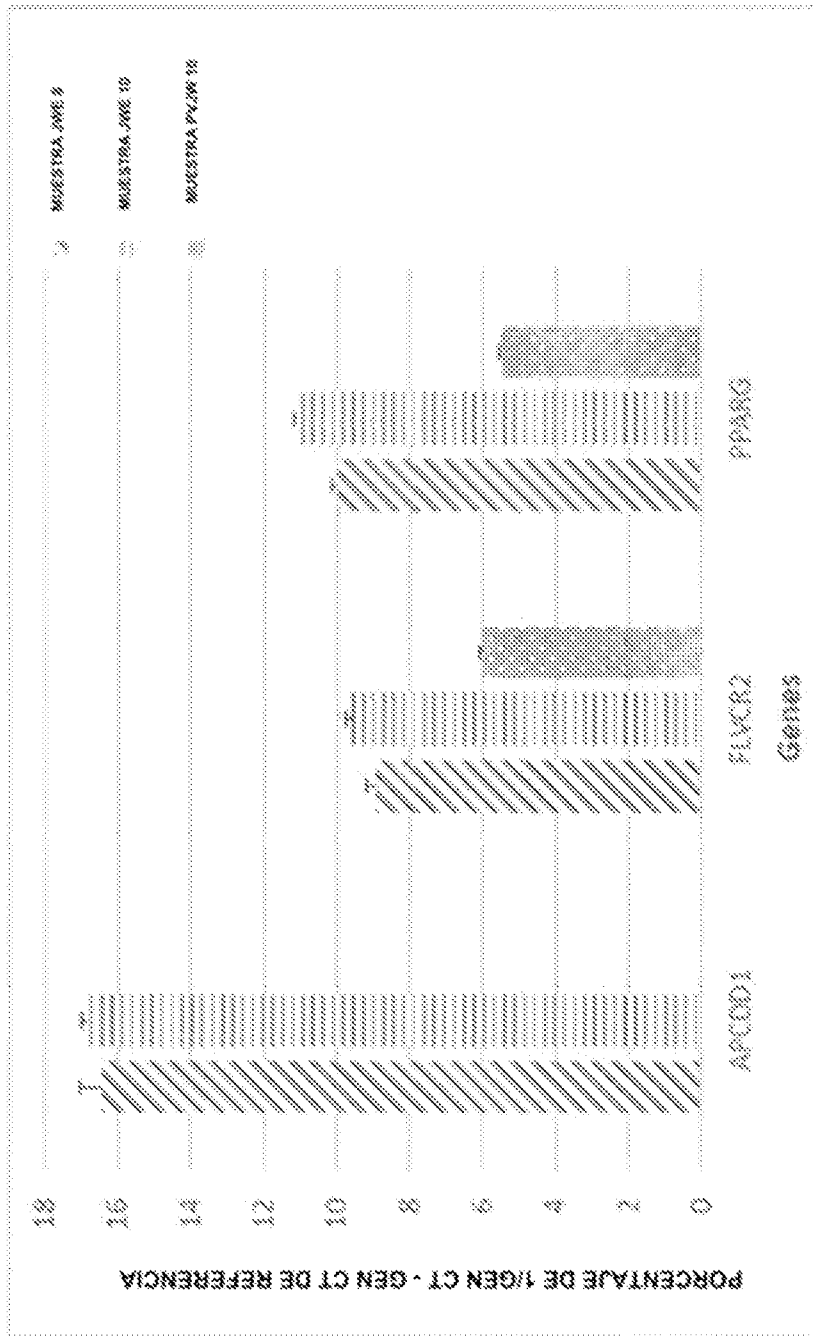


Fig. 8

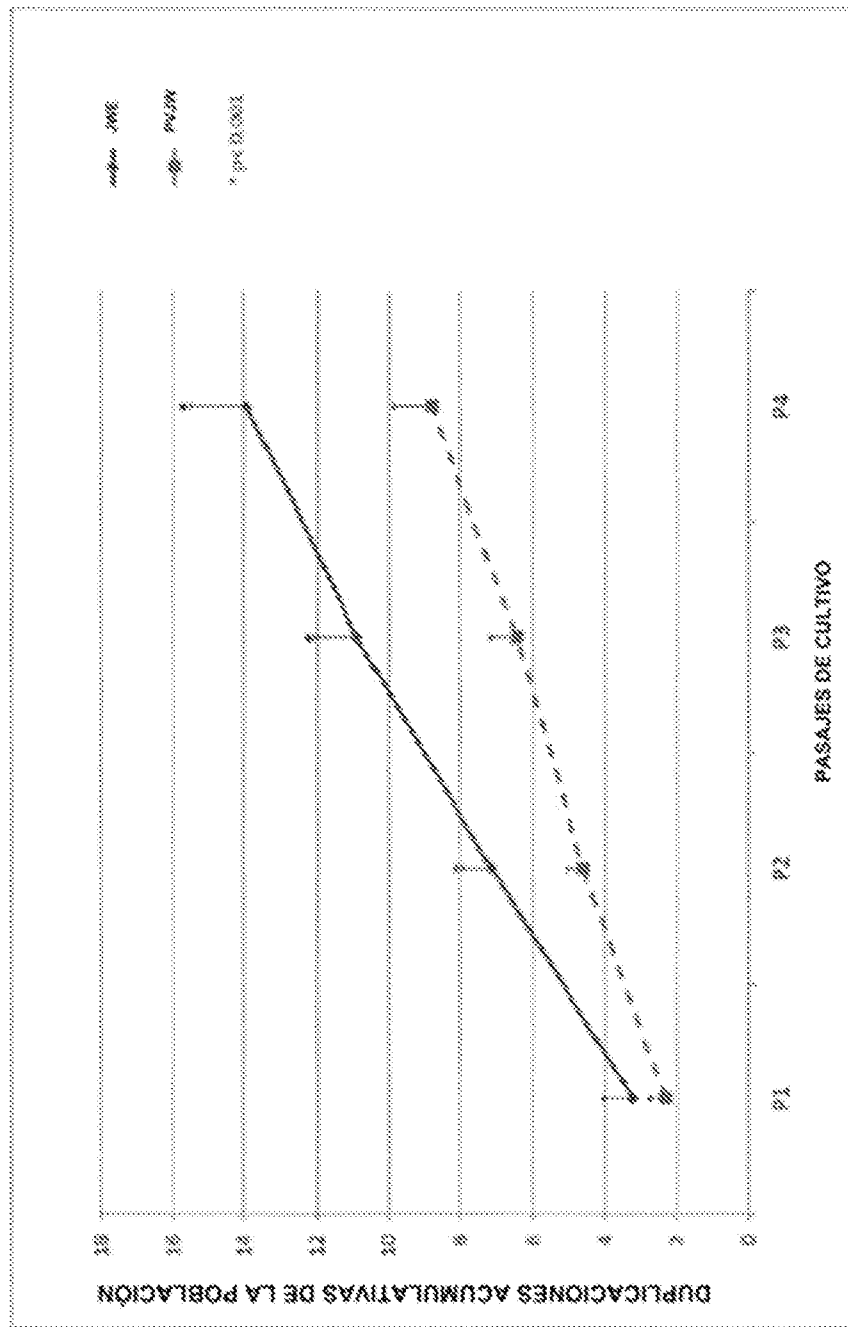


Fig. 6

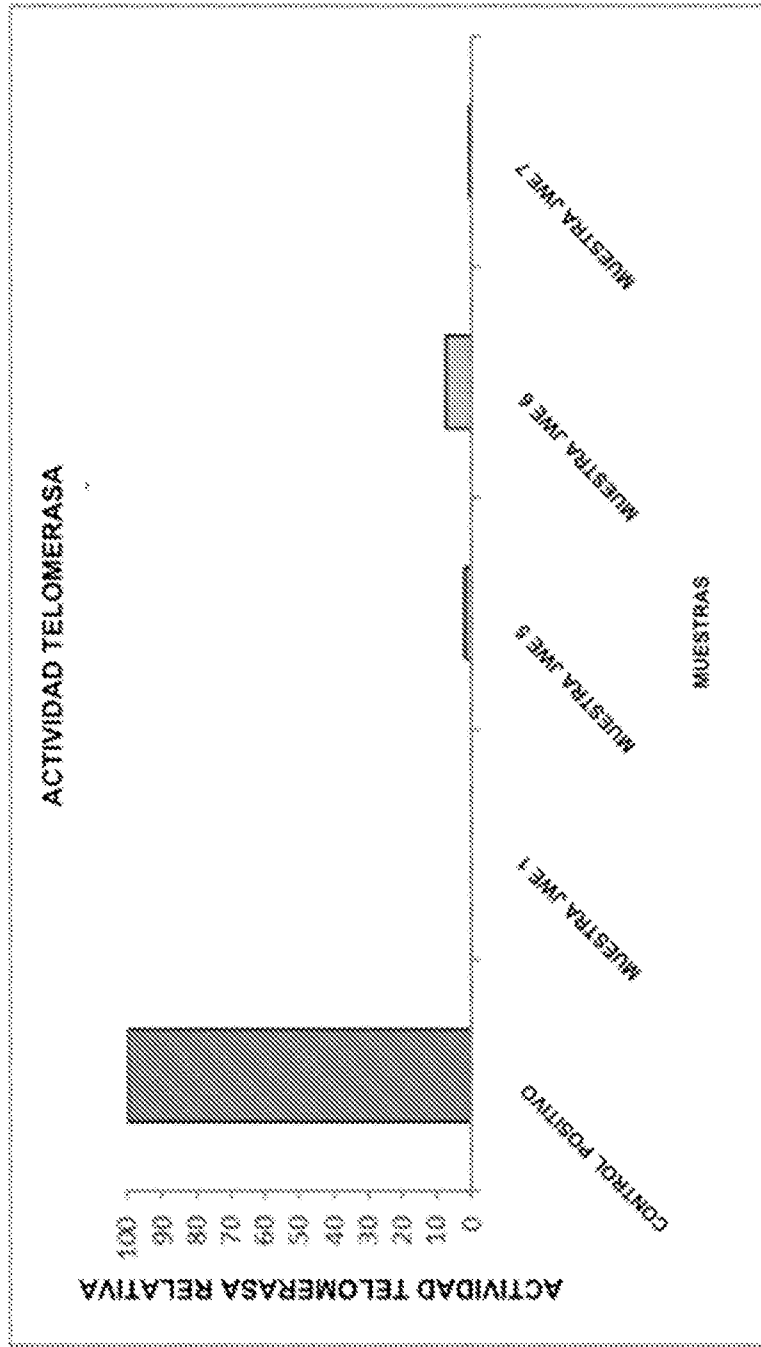


Fig 10

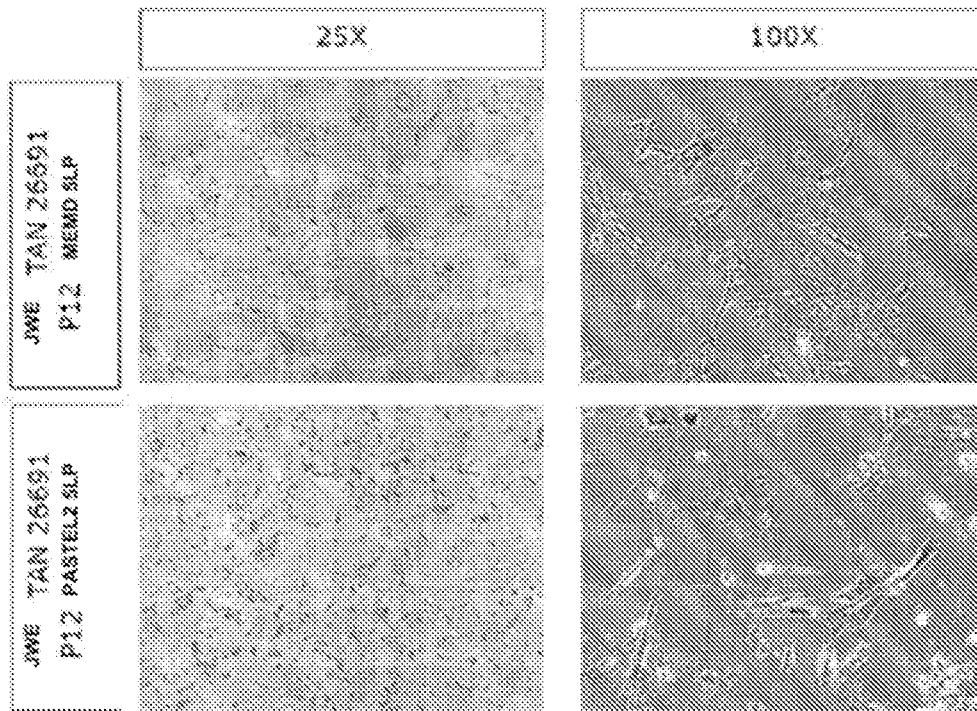


Fig. 11A

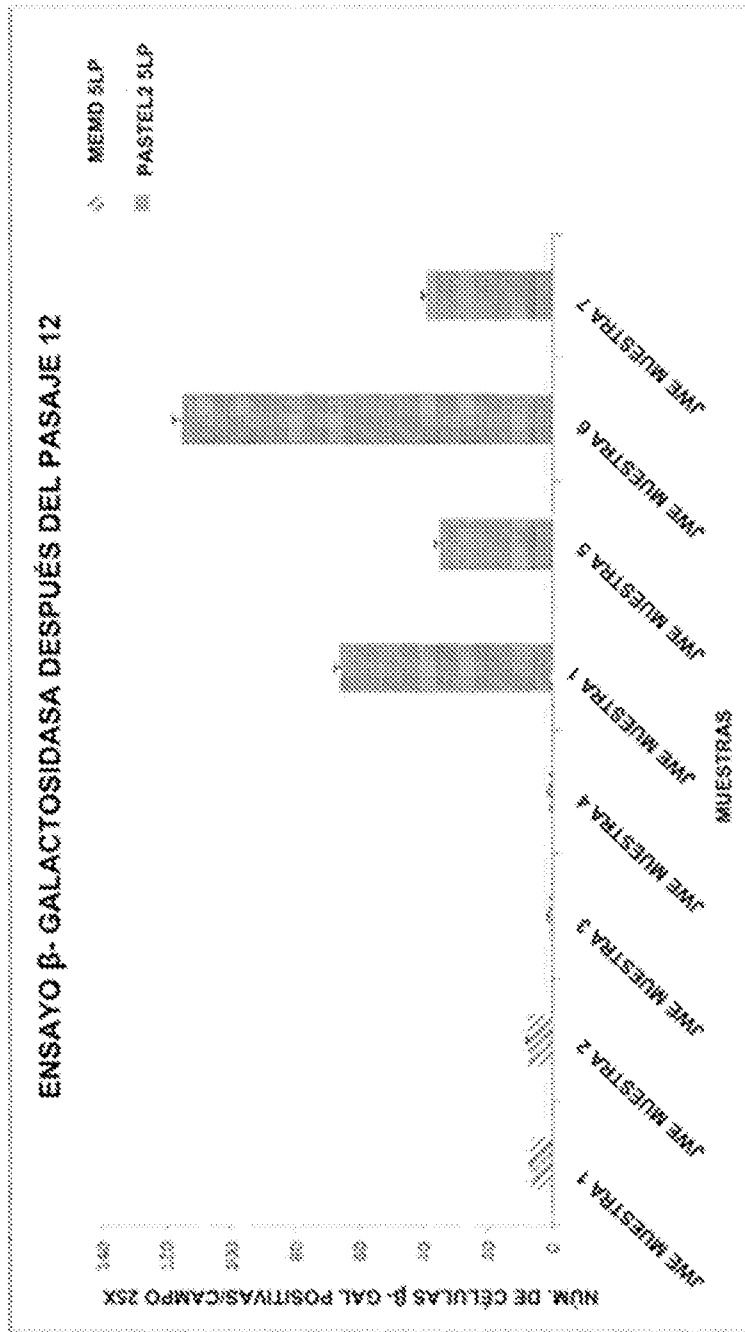


Fig. 11B

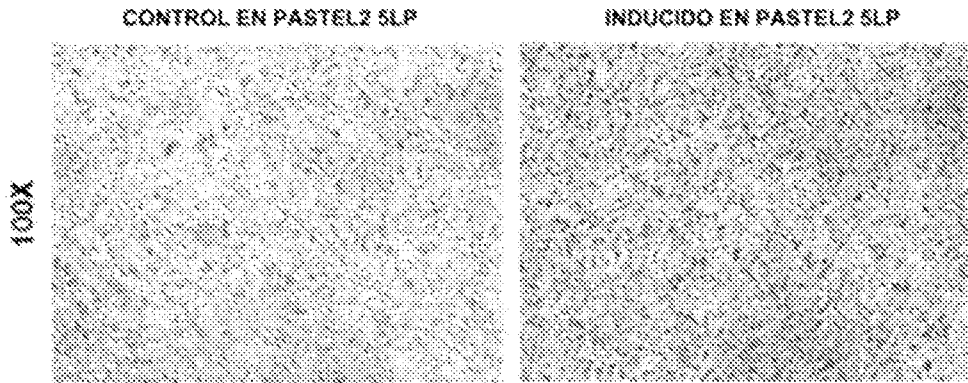


Fig 12A

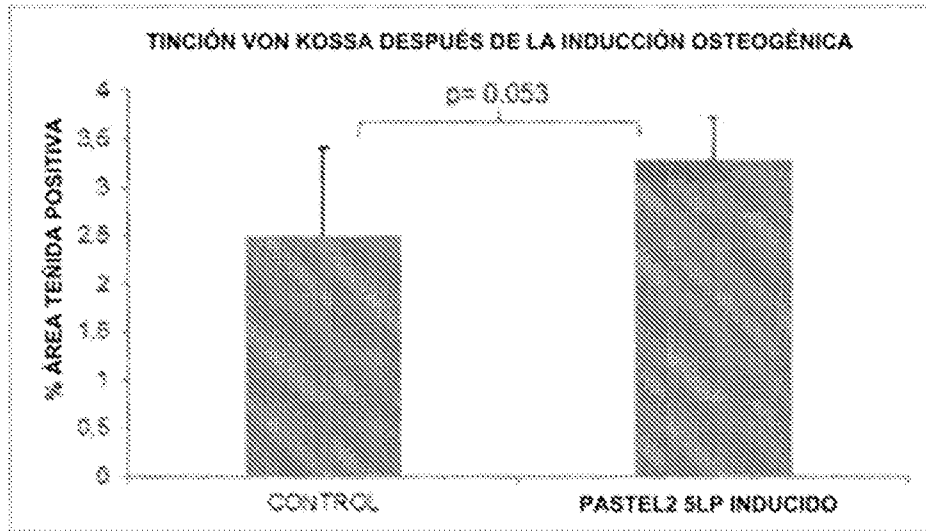


Fig. 12B

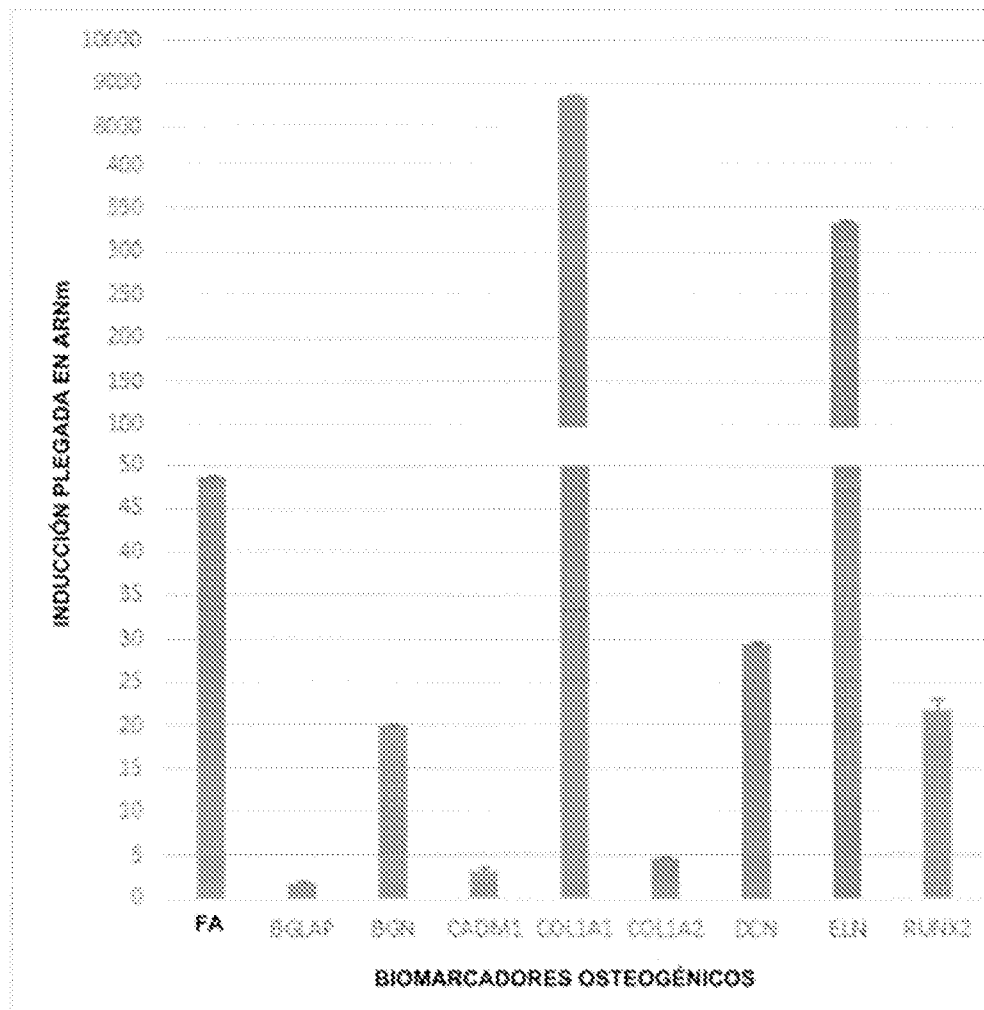


Fig. 12C

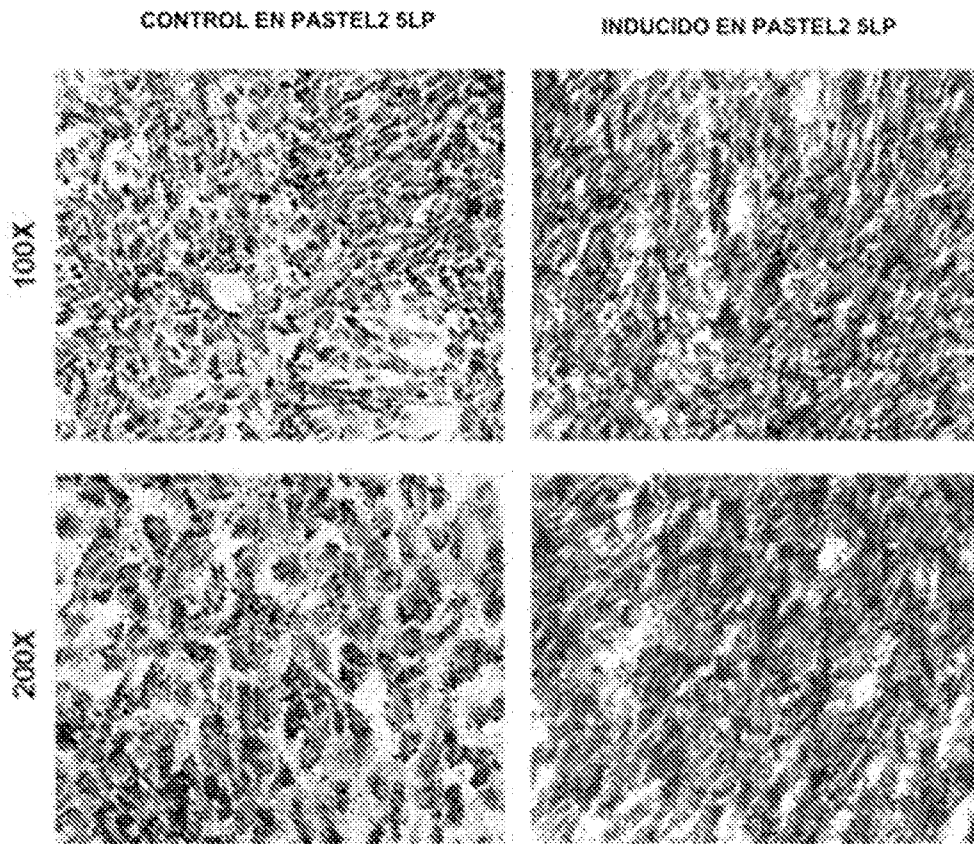


Fig.13

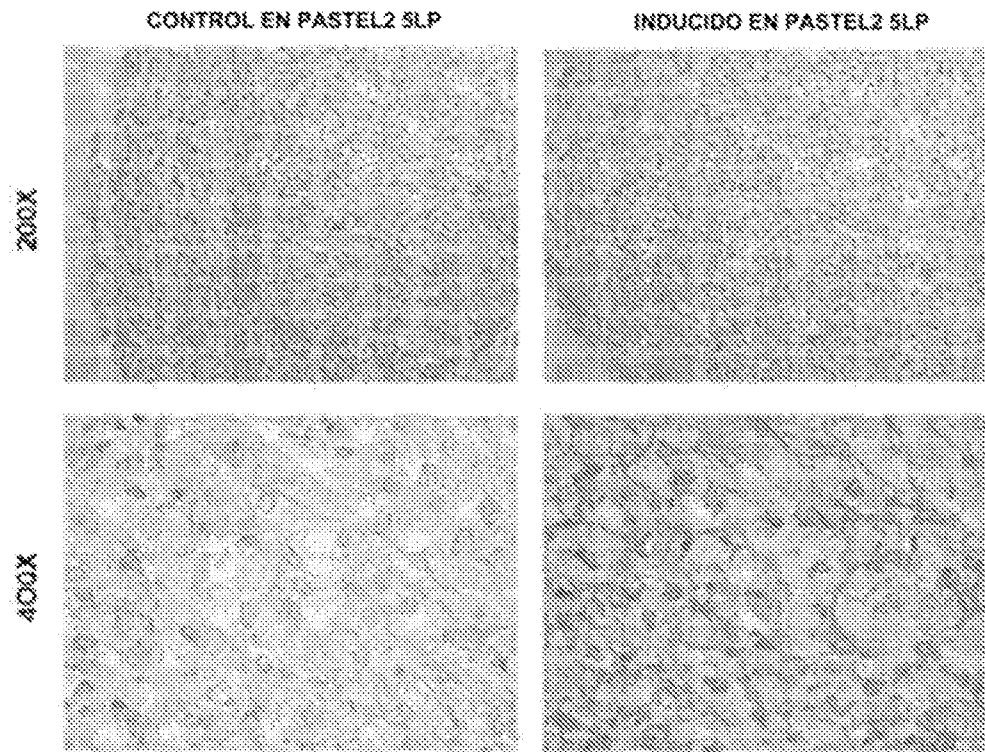


Fig. 14