

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 841**

51 Int. Cl.:

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2006 E 06799473 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1941027**

54 Título: **Métodos y medios para la proliferación de células madres y generación y expansión posterior de células progenitoras, así como producción de células efectoras como terapéuticos clínicos**

30 Prioridad:

28.09.2005 EP 05077221

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

06.10.2014

73 Titular/es:

**IPD-THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Onderwijsboulevard 219
5228 DE's-Hertogenbosch, NL**

72 Inventor/es:

SPANHOLTZ, JAN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 502 841 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

- Métodos y medios para la proliferación de células madres y generación y expansión posterior de células progenitoras, así como producción de células efectoras como terapéuticos clínicos.
- 5 La invención se refiere al campo de la biología médica moderna. Particularmente la invención se refiere a la tecnología de células madres. Más particularmente la invención se refiere a la tecnología de células madres perinatales, particularmente tecnología de células madres de cordón umbilical.
- 10 Las células madres son células indiferenciadas primordiales que tienen la habilidad de auto-renovación y la habilidad de diferenciarse en otros tipos de células. Esta habilidad les permite actuar como un sistema de reparación para el cuerpo, reponer otras células mientras el organismo está vivo.
- 15 Las células madres se clasifican por potencia que describe la especificidad de esa célula.
- Las células madres totipotentes son células que tienen la habilidad de auto-renovación y son capaces de diferenciarse en cualquier y todos los tipos celulares para formar un nuevo organismo completo. Ellas se producen típicamente por la fusión de un óvulo y un espermatozoide. Las células producidas por las primeras pocas divisiones del óvulo fertilizado además son totipotentes. Estas células pueden convertirse en cualquier tipo de célula sin excepciones.
- 20 Las células madres pluripotentes son las descendientes de las células totipotentes y pueden convertirse en cualquier tipo celular excepto por las células madres totipotentes.
- 25 Las células madres multipotentes pueden producir solamente células de una familia de células estrechamente relacionadas (por ejemplo las células madres hematopoyéticas pueden diferenciarse en células de la sangre tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas).
- Las células progenitoras (algunas veces llamadas unipotentes) pueden producir solamente un tipo celular; pero, tienen la propiedad de auto-renovación que las distingue de las células no madres.
- 30 Las células madres además se categorizan de acuerdo con su fuente, como adultas o embrionarias.
- Las células madres adultas son células indiferenciadas encontradas entre las células diferenciadas de un tejido específico y son en su mayoría células multipotentes. Con más precisión se les llama células madres somáticas, porque no necesitan venir de adultos sino que además pueden venir de niños o de cordones umbilicales.
- 35 Las células madres embrionarias son células obtenidas a partir de la masa interior indiferenciada de un blastocito, un embrión en una etapa temprana de 50 a 150 células.
- 40 La sangre de la placenta y el cordón umbilical que quedan después del nacimiento es una fuente de células madres adultas. Se recogen al separar el cordón umbilical, limpiarlo y extraer la sangre de la vena umbilical.
- 45 Los glóbulos rojos se pueden eliminar de la sangre del cordón y las células remanentes se pueden usar o almacenar (por ejemplo en nitrógeno líquido).
- Las células madres mismas son útiles en muchas aplicaciones de la llamada medicina regenerativa. Se usan para tratar enfermedades del corazón, reparar médulas espinales y muchas otras enfermedades donde los tejidos de todo tipo necesitan remplazarse.
- 50 Las células madres además pueden usarse para producir ciertos tipos de células diferenciadas que son células efectoras en ciertas enfermedades.
- Desafortunadamente sin embargo, las células madres están presentes en el cuerpo de un mamífero en diminutas cantidades solamente. A menudo están presentes en órganos o tejidos que no se alcanzan con facilidad. Las células madres embrionarias además no se obtienen fácilmente y solamente en diminutas cantidades. Además, hay algunas preocupaciones éticas en el crecimiento de embriones meramente con el propósito de producir células madres. Hay por lo tanto una necesidad de métodos para multiplicar células madres disponibles y/o progenie específicas de linaje primitivo de estas, sin que se diferencien en descendientes menos potentes. Las células madres totipotentes deben permanecer totipotentes después de la expansión y no convertirse en células madres pluripotentes, las células madres pluripotentes

deben permanecer pluripotentes, etc. En algunos casos el cambio a un descendiente menos potente puede ser aceptable (al menos hasta cierto punto) siempre que el potencial para la auto-renovación y al menos la multipotencia se retengan.

5 Aunque las células madres tienen la habilidad de auto-renovación, mantener células madres en cultivo, no es una tarea fácil. En su sentido más amplio la presente invención proporciona un medio y un método para el cultivo y/o la expansión y/o la diferenciación de células madres que comprende un número de elementos que son extremadamente adecuados justo para ese propósito, con la condición de que las células no son células embrionarias humanas. Las "células madres" de la presente invención no son células embrionarias humanas.

10 Así en una modalidad la invención proporciona un medio para cultivar, expandir y/o diferenciar células madres, dicho medio que comprende un medio de cultivo celular básico, 1-20 % suero humano, 2-10 mmol/l O-acetil-L-carnitina o un equivalente funcional de este, 40-80 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada o un equivalente funcional de esta y una combinación de citocinas adecuadas, que preferentemente abarca tres o más de trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , y LIF, y suplementos convencionales adicionales, tales como L-glutamina, antibióticos, ácido ascórbico, selenito de selenio y etanolamina. Las citocinas dadas se seleccionan por sus funciones. Para algunas de las citocinas dadas hay otras citocinas que al menos en parte serán capaces de realizar la misma función. Aquellas pueden entonces por supuesto sustituir las enumeradas.

20 Preferentemente un medio de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 3-8, con mayor preferencia aproximadamente 5 mmol/l de O-acetil-L-carnitina. Un equivalente funcional puede estar presente en diferentes cantidades que son equivalentes en actividad a las cantidades dadas para la O-acetil-L-carnitina.

25 Preferentemente un medio de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 50-70, con mayor preferencia aproximadamente 60 mg/l de heparina N-desulfatada-N-acetilada. Un equivalente funcional puede estar presente en diferentes cantidades que son equivalentes en actividad a las cantidades dadas para la heparina N-desulfatada-N-acetilada.

Las cantidades de citocina añadidas son convencionales en la técnica, cantidades preferidas se dan en los ejemplos, pero desviaciones del 10 % en cantidad son muy aceptables y dentro del alcance de la presente invención.

30 Muchos medios básicos son conocidos. Más abajo, se da una selección pero muchos más se pueden comprar a empresas como Invitrogen. Los medios básicos incluyen pero no se limitan a BEM (medio de Eagle básico), DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), medio esencial mínimo de Glasgow, medio basal M199, HAM F10, HAM F12, DMEM de Iscove, Leibovitz L15, MCDB, McCoy 5A, etc.

35 Se pueden usar además las combinaciones de estos medios básicos y combinaciones de DMEM y HAM F12 se prefieren para algunos medios de diferenciación de acuerdo con la invención. Las cantidades dadas en la presente descripción son típicamente adecuadas para cultivos que comienzan con aproximadamente 1 millón de células por ml. Las cantidades se pueden adaptar para las diferentes cantidades de células con las que comienzan los cultivos.

40 Los medios de acuerdo con la invención pueden variar en su contenido de suero, preferentemente junto con una combinación diferente de citocinas para proporcionar ya sea un medio de expansión o un medio de diferenciación.

45 Así, en una modalidad de la presente invención se proporciona un medio y un método para la proliferación de células madres embrionarias no humanas con la subsecuente generación de células progenitoras específicas de linaje primitivo, particularmente células madres de sangre de cordón, de forma que la proliferación de las células madres produce una célula madre hija y una célula madre de progenitor primitivo, la última con la habilidad de auto-renovación extensiva y maduración funcional. Típicamente a partir de 1 millón de células de una población enriquecida en células madres se pueden generar 1×10^8 progenitores primitivos mientras se mantiene el conjunto de células madres. Cada progenitor primitivo es capaz de producir $> 1 \times 10^3$ células efectoras funcionales maduras. La población enriquecida de células madres se puede aislar células CD34+ y/o células CD133+. La adición de monocitos enriquecidos en células CD14+ mejora la amplificación así como la maduración de las células deseadas.

50 La presente invención en dicha modalidad proporciona un medio para expandir células madres que comprende un medio de cultivo celular básico, 10-20 % suero humano, 2-10 mmol/l O-acetil-L-carnitina o un equivalente funcional de este, 40-80 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada o un equivalente funcional de esta y una combinación de citocinas adecuadas, que preferentemente abarca tres o más de trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , y LIF, y suplementos convencionales adicionales, tales como L-glutamina, antibióticos, ácido ascórbico, selenito de selenio y etanolamina.

60 Preferentemente, un medio para expansión de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 15 % de suero

humano, preferentemente suero AB. Preferentemente un medio para expansión de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 5 mmol/l O-acetil-L-carnitina. Preferentemente un medio para expansión de acuerdo con la invención comprende 60 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada. El medio básico preferido es RPMI1640.

5 En una modalidad preferida adicional un medio para expansión de acuerdo con la invención comprende trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , LIF, VEGF, bFGF, IL-3 e IL-7 en cantidades convencionales, preferentemente en las cantidades dadas en los ejemplos.

10 En otra modalidad la invención proporciona medio de diferenciación para la diferenciación en progenitores de células Asesinas Naturales, preferentemente dos medios para dos etapas en la diferenciación, para cuyos medios la cantidad de suero está entre 5-10 %. Preferentemente la cantidad de suero es aproximadamente 8 %. Preferentemente un medio para diferenciación de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 5 mmol/l O-acetil-L-carnitina. Preferentemente un medio para diferenciación de acuerdo con la invención comprende 60 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada. El medio básico preferido es una mezcla 2:1 (v/v) de DMEM y HAM-F12.

15 Una combinación preferida de citocinas para el primer paso en la diferenciación es TPO, FLT-3L, SCF, IL-7, VEGF, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6. Este medio se aplica preferentemente después de la expansión de las células madres por aproximadamente tres días, preferentemente la expansión en un medio de expansión de acuerdo con la invención.

20 Preferentemente la primera etapa de diferenciación en progenitores de células asesinas naturales es seguida por una etapa de diferenciación adicional aproximadamente tres días más tarde (6 días después de cosecharse o descongelarse) con un medio de diferenciación secundario diferente de acuerdo con la invención en el que las células deben cultivarse por aproximadamente 9-24, preferentemente 12-22 días).

25 Un segundo medio de diferenciación de acuerdo con la invención comprende 5-10 % de suero humano (preferentemente AB), preferentemente aproximadamente 8 % suero humano.

30 Preferentemente un segundo medio de diferenciación de acuerdo con la invención comprende aproximadamente 5 mmol/l O-acetil-L-carnitina. Preferentemente un segundo medio de diferenciación de acuerdo con la invención comprende 60 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada. El medio básico preferido es una mezcla 2:1 (v/v) de DMEM y HAM-F12. Una combinación preferida de citocinas para la segunda etapa en la diferenciación es TPO, FLT-3, SCF, IL-7, IL-15, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, IL-6, MIP-I- α .

35 Este medio debe refrescarse entre 3-8, preferentemente aproximadamente 6 días.

40 La invención además abarca métodos para mantener mientras proliferan células madres con la generación y expansión de células progenitoras postembrionarias, particularmente células madres de sangre de cordón umbilical, que comprende cosechar las células madres de sangre del cordón, cultivar dichas células en un medio de acuerdo con la invención y separar las células expandidas de dicho medio. La invención adicionalmente comprende métodos para diferenciar células madres en células progenitoras de NK que comprenden cultivar dichas células madres, particularmente células madres derivadas de sangre de cordón umbilical, en un medio de diferenciación de acuerdo con la invención y preferentemente cultivar dichas células madres en un primer y un segundo medio de diferenciación en un esquema como se da en la detallada descripción más abajo. El cultivo debe ocurrir bajo condiciones convencionales adecuada que típicamente abarcan temperaturas de aproximadamente 37 grados Celsius, 100 % RH, 10 % O₂ y 5-7 % CO₂.

45 Las células madres que proliferaron y se mantuvieron producidas por un proceso de acuerdo con la invención, se describen en la presente descripción.

50 Las células asesinas naturales progenitoras producidas por un método de acuerdo con la invención, se describen en la presente descripción.

55 En una modalidad adicional la invención comprende un conjunto de medios (estuche de partes) para la proliferación y mantenimiento de células madres, particularmente derivadas de sangre de cordón) y la generación de células progenitoras de NK primitivas, que comprende un medio de expansión de acuerdo con la invención, un primer y un segundo medios de diferenciación de acuerdo con la invención y preferentemente un folleto de instrucciones para el uso de los medios.

60 Las células progenitoras de NK se pueden diferenciar a células NK maduras y funcionales que reconocen un objetivo deseado por receptores específicos en sus superficie conocidos por los expertos en el campo (CD56, CD16, CD107, NKG2a/CD94, antígenos NKp, receptores KIR). Estas células NK maduras y funcionales se pueden generar in vitro por la extensión del período de cultivo 2-3 semanas más. Sin embargo, como terapéutico celular se prefiere la inyección de

5 progenitores primitivos y la maduración in vivo. Estas células NK se pueden usar en el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad humana preferentemente todas las enfermedades malignas tales como tumores, cáncer, en particular leucemias, de ovario, de colon y cáncer de la piel, mama, cáncer de cerebro y pulmón, cáncer cervical y metástasis de todos los tipos de cáncer, particularmente del hígado, así como todas las enfermedades virales, en particular VIH, y otras enfermedades crónicas virales. Los métodos para (expandir y) diferenciar células madres en células progenitoras de NK y más adelante en células NK son además parte de la presente invención.

10 Se describen las células NK específicas al objetivo producidas por estos métodos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden células progenitoras o células NK maduras de acuerdo con la invención y más aun que comprenden constituyentes usuales de tales composiciones se describen en la presente descripción. Las dosis para tales composiciones farmacéuticas generalmente se expresan en el número de células viables presentes en tal composición. Dicho número debe estar entre $1 \cdot 9 \times 10^6$ NK-IC o $>1 \cdot 10 \times 10^8$ NK-células maduras por kg de peso corporal de un sujeto a tratar.

15 En otra modalidad la invención comprende un medio para diferenciar células madres (expandidas) en células progenitoras vasculares.

20 En esta modalidad un (primer) medio de diferenciación preferido comprende un medio básico (preferentemente medio basal M199) con aproximadamente 7-12, preferentemente aproximadamente 10 % de suero humano (preferentemente AB), aproximadamente 4-6, preferentemente aproximadamente 5 mmol/l de O-acetil-L-carnitina, aproximadamente 60 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada.

25 Se prefiere la siguiente combinación de citocinas: SCGF, VEGF, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L, IL-1 β , GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6. Las cantidades nuevamente son preferentemente aquellas dadas en los ejemplos, aunque desviaciones del 10 % serán típicamente aceptables. Otros constituyentes usuales para medios de cultivo como los dados antes en la presente descripción pueden por supuesto añadirse.

30 Se prefiere aumentar más aún la diferenciación a células VP por el cultivo de las células en un segundo medio de diferenciación. El esquema preferido se da en la descripción detallada, aunque tal esquema no es crítico. La longitud de las diferentes etapas de cultivo puede variarse.

Este segundo medio de cultivo difiere del primero en la cantidad de suero humano presente, que debe ser aproximadamente 1-4 %, preferentemente aproximadamente 2 %.

35 El conjunto de citocinas preferido es SCGF, VEGF, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L e IL-1 β .

Las células progenitoras vasculares se pueden producir por un método de acuerdo con la invención. Estas células se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad cardio-vascular que involucre la generación de nuevos vasos sanguíneos o nuevo endotelio.

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células progenitoras vasculares se describen. La cantidad de células por dosis típicamente comprenderá al menos 1×10^6 células viables por dosis.

45 En una modalidad adicional la invención comprende un conjunto de medios (estuche de partes) para la expansión y diferenciación de células madres, particularmente derivadas de sangre de cordón) en células progenitoras vasculares, que comprende un medio de expansión de acuerdo con la invención, un primer y un segundo medios de diferenciación de acuerdo con la invención y preferentemente un folleto de instrucciones para el uso de los medios.

50 Los métodos para diferenciar células madres en células progenitoras vasculares y más adelante en nuevo endotelio y vasos sanguíneos funcionales que llevan a la revascularización del tejido son además parte de la presente invención.

La invención se explicará en más detalles en la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada

55 La siguiente descripción describe un método para la generación in vitro de terapéuticos celulares para el uso clínico que pueden derivarse de pequeñas alícuotas de células madres postembrionarias. Este procedimiento se caracteriza por el cultivo de células madres postembrionarias en un medio específicamente formulado con una composición definida así como un procedimiento de manejo del cultivo definido para rendir suficientes progenitores para la aplicación clínica.

60 La invención descrita aquí se basa al menos en parte en el problema técnico de que para el tratamiento de enfermedades

malignas, es decir cáncer, leucemias y linfomas así como para las enfermedades cardiovasculares la disponibilidad de terapias celulares es muy limitada. Con la excepción de muy escasos trasplantes de células madres hematopoyéticas por medio del uso de sangre de cordón umbilical (UCB), las células madres postembrionarias no se han usado para tratamientos celulares dirigidos en el marco del trasplante no alogénico sin altas dosis de quimioterapia/radiación de acondicionamiento del paciente fundamentalmente debido al hecho, de que no hay suficientes células progenitoras dirigidas para la terapia celular disponibles todavía. Adicionalmente, estas células son aloreactivas y causan una severa enfermedad de injerto-contra huésped en el recipiente si el tratamiento y producto celular no se eligen de forma óptima.

El problema técnico se resolvió al menos parcialmente en esta invención al proporcionar procedimientos prácticos para generar suficiente número de progenitores para tratamientos seleccionados como se indicó antes en la presente descripción. El problema técnico de la generación del progenitor seleccionado de células madres postembrionarias humanas para aplicación clínica puede resolverse por la aplicación de procedimientos bien definidos de etapas de cultivo *in vitro* así como cambios específicos de las condiciones de cultivo como se describe en la sección de métodos. Estos procedimientos permiten por primera vez producir progenitoras vasculares (células VP) y/o células asesinas naturales (célula NK) progenitoras para aplicación clínica a partir de pequeñas alícuotas de células madres postembrionarias.

Las siguientes células madres postembrionarias que pueden obtenerse comenzando a partir de la semana 12 después de la gestación a partir de hígado fetal, sangre perinatal de cordón umbilical (UCB), médula ósea humana o sangre periférica estimulada con G-CSF se pueden aislar y usar para procedimientos de cultivo de acuerdo con la invención. La persona con experiencia en la técnica conoce métodos para recolectar estas células madres, por lo cual la cosecha a partir de sangre de cordón umbilical perinatal o placenta se prefiere para los procedimientos de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida adicional de los procedimientos de acuerdo con la invención se realiza una prueba funcional del terapéutico celular final consecutiva al cultivo. Es especialmente preferida la prueba de las características progenitoras de las células asesinas naturales (células- NK) así como de las células progenitoras vasculares (células-VP) por el establecimiento de sistemas de ensayos *in vitro*.

El siguiente ejemplo ilustra la invención:

1. Iniciación del cultivo *in vitro*

Pequeñas alícuotas de células madres postembrionarias (mínimo 25 ml de sangre de cordón umbilical; una cantidad que está bien por debajo de la mínima cantidad requerida para el banco clínico) se procesan de acuerdo a procedimientos de operación estándar de lisis de glóbulos rojos para obtener células nucleadas para procesamiento adicional. Como una opción las células se pueden purificar más aun por separación inmunomagnética de células de acuerdo con el fabricante (Miltenyi-Biotec, Alemania) en células CD34+ enriquecidas (o alternativamente células CD133+) y además también se pueden separar células CD14+. La persona experta en este campo será capaz de realizar estas separaciones celulares de acuerdo con el fabricante. Estas células se ponen en frascos de cultivo o bolsas de Teflón que contienen el llamado medio de **Iniciación-Tecnología-Glycostem o GTI**: El medio en este ejemplo consiste de RPMI1640 (Invitrogen Inc.) que contiene 15 % suero AB humano (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) o derivados en una concentración final de 5 mmol/l, heparina N-desulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) en una concentración de 60 mg/l. Las siguientes citocinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente, todas las citocinas han sido proporcionadas por tecnología de células madres Inc. o R&D Systems): trombopoyetina (TPO; 25 ng/ml); ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), factor de células madres (SCF; 25 ng/ml), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/ml), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; 10 ng/ml), interleucina-3 (IL-3; 2,5 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 10 ng/ml), factor de crecimiento tipo insulina (IGF; 10 ng/ml), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/ml Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (200 pg/ml; MIP-1 alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/ml). Los suplementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomina 100 U/ml (Invitrogen), 25 µM 2-mercaptoetanol-beta (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenito de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma). La relación final de medio a células inoculadas es 1×10^6 células totales por 1 ml de medio. El inicio del cultivo se puede realizar en 2 formas alternativas.

a) inoculación de células nucleadas después de la lisis de glóbulos rojos en medio-GTI

b) inoculación de las células CD34+ separadas (o alternativamente células CD133+) junto con las células CD14+ como suplemento en medio-GTI en una relación de 1 célula CD34+ [o alternativamente células CD133+]: 1 célula CD14+

c) inoculación de las células CD34+ separadas (o alternativamente células CD133+) en medio-GTI

Las células se cultivan en el medio y las proporciones mencionados anteriormente bajo condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas ilustrativas con respecto a los contenedores de cultivo, temperatura, humedad relativa, contenido de O₂ y CO₂ de la fase gaseosa adecuados se conocen por los expertos. Preferencialmente las células se cultivan en el medio

mencionado anteriormente bajo las siguientes condiciones: (a) 37 °C, (b) 100 % humedad relativa, (c) 10 % O₂ y (d) 5 % a 7 % CO₂.

2. decisión de diferenciación en el día 3 *in vitro*:

En el día 3 de cultivo se realiza la suplementación del primer medio. En este punto, el cultivo de suspensión celular se lleva a ya sea diferenciación a célula-NK o diferenciación a progenitor vascular (VP).

Esto se puede hacer en dos formas:

- a) El producto completo se diferencia más aun solamente en una de las dos rutas de diferenciación (ya sea diferenciación a NK o VPC)
- b) El producto se divide según se requiera y una alícuota se diferencia más aun en progenitoras-NK, la otra en progenitoras-VPC.
- c) Las células adherentes se diferencian en VPC, las células no-adherentes se diferencian más aun en progenitoras-NK.

2.1. Generación del producto progenitor de célula asesina natural

La cantidad designada del producto del cultivo celular inicial se suplementa el día 3 después del inicio del cultivo con medio Tecnología-Glycostem-Nk-día3 (GTNKd3) (1 ml medio-GTNKd3 por 1x10⁶ células totales introducidas). Al día 6 el cultivo en suspensión se suplementa con medio Tecnología-Glycostem-Nk-día6 (GTNKd6) (2 ml medio-GTNKd6 por 1x10⁶ células totales introducidas). Desde el día 9 después de iniciado el cultivo la suplementación de medio ocurre de la siguiente forma:

- Día 9: adición de 4 ml de medio GTNKd6 por 1x10⁶ células totales introducidas
- Día 12: adición de 8 ml de medio GTNKd6 por 1x10⁶ células totales introducidas
- Día 15: adición de 16 ml de medio GTNKd6 por 1x10⁶ células totales introducidas

A los días 18-21 todas las células se cosechan y se realizan dos etapas de lavado en PBS que contiene 1 % suero AB humano de acuerdo con los procedimientos de operación estándar conocidos a las personas expertas en el campo. Después las células se resuspenden en solución de NaCl fisiológica (0,9 %) para la infusión en el paciente. Después de la infusión, los NK-IC-progenitoras, se generaron específicamente para madurar dentro del cuerpo del pacientes (*in vivo*) y finalmente diferenciarse *in vivo* en células asesinas naturales funcionales, que son capaces de matar células tumorales objetivo específicas. Por esta razón el paciente se trata preferentemente inmediatamente después de la infusión con IL-2 subcutánea (Proleukin[®]) a una dosis de 2x10⁶ IU/kg peso corporal.

Una pequeña alícuota (200 células totales) se usa para el control de aseguramiento de la calidad del producto para enumerar el número de célula-NK progenitoras en el producto final por medio del uso de ensayos de NK-IC bien establecidos como se describe en la literatura (Miller y otros, 1999; Punzel y otros, 1999).

Ejemplo experimental: En 3 muestras UCB independientes (cantidad entre 26-59 ml; TNC [células nucleadas totales] en el intervalo desde 2-6 x10⁸) se podrían generar progenitores NK-IC con un conteo de células totales entre 1,1-1,9 x10⁸. A partir de que 1 única NK-IC genera > 1000 células- NK maduras *in vivo*, un mínimo de 10 paquetes cada uno con la capacidad de generar 1 x10⁸/células- NK maduras/ kg de peso corporal se pueden criopreservar hasta su uso de acuerdo con procedimientos de operación estándar conocidos por los expertos en el campo.

Medio:

Medio GTNKd3

El medio consiste de DMEM/Medio F12 de Ham (Invitrogen Inc.) relación de volumen 2:1 (V/V) con 8 % suero AB- humano (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) o derivados en una concentración final de 5 mmol/l, heparina N-desulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) en una concentración de 60 mg/l. Las siguientes citocinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente, todas las citocinas han sido proporcionadas por tecnología de células madres Inc. o R&D Systems): trombopoyetina (TPO; 25 ng/ml); ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), factor de células madres (SCF; 25 ng/ml), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/ml), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; 10 ng/ml), interleucina-2 (Proleukin[®] [Chiron]; 750 U/ml), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/ml Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (200 pg/ml; MIP-1 alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/ml). Los suplementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomina 100

U/ml (Invitrogen), 25 µM 2-mercaptoetanol-beta (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenito de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma).

Medio GTNKd6

5 El medio consiste de DMEM/Medio F12 de Ham (Invitrogen Inc.) relación de volumen 2:1 (V/V) con 8 % suero AB- humano (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) o derivados en una concentración final de 5 mmol/l, heparina N-desulfatada-N-acetilada (Seigagaku Amerika Inc.) en una concentración de 60 mg/l. Las siguientes citocinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente, todas las citocinas han sido proporcionados por tecnología de células madres Inc. o R&D Systems): trombopoyetina (TPO; 25 ng/ml); ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), factor de células madres (SCF; 25 ng/ml), interleucina-7 (IL-7; 25 ng/ml), interleucina-15 (IL-15; 25 ng/ml), interleucina-2 (Proleukin® [Chiron]; 1500 U/ml), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/ml Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inhibidor de Leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (200 pg/ml; MIP-I alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/ml). Los suplementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomycin 100 U/ml (Invitrogen), 25 µM 2-mercaptoetanol-beta (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenita de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma).

20 Ensayo de NK-IC para el control de la calidad: Este ensayo enumera el número de células-NK-progenitoras primitivas que se generaron en el día 18 de cultivo. Cada progenitor NK-IC único puede dar lugar a > 1000 células- NK maduras y funcionales. Así, este ensayo proporciona una lectura y un instrumento de control de la calidad valioso para el producto. La pequeña alícuota de células expandidas (200 células) se sembraron en placas de 96 pozos en ensayos de dilución limitante en cocultivos AFT024 suplementado con medio que consiste de medio DMEM/Medio F12 de Ham 2:1 (V/V) con 20 % suero humano AB inactivado por calor y 20 mg/ml de ácido ascórbico, 50 µmol selenito de selenio, 25 µmol β-mercaptoetanol, 50 µmol etanolamina, 1000 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-3 [solo inicialmente], 10 ng/ml Flt-3L, 10 ng/ml SCF y 20 ng/ml IL-7. Después de 5-7 semanas de cultivo, las células se analizaron fenotípicamente para células NK maduras y funcionales (CD56+/CD3-/CD16/NKp30/NKp44/NKp46, NKG2A/CD94, CD107).

2.2. *Generación de productos de células progenitoras vasculares*

30 La cantidad designada del producto del cultivo celular inicial tiene que colocarse en un frasco de 175 cm² de cultivo de tejido recubierto de fibronectina el día 3 después del inicio y necesita suplementarse más aun con medio **Tecnología-Glycostem-Progenitor-Vascular día 3** (GTVPd3) (15 ml medio GTVPd3 por frasco de 175 cm²). En el día 6 todas las células no adherentes tienen que eliminarse y la suplementación de medio tiene que ocurrir a partir del día 6 de la siguiente manera:

Día 6:	intercambio de 15 ml de medio GTVPd6 por frasco
Día 12:	intercambio de 15 ml de medio GTVPd6 por frasco
Día 18:	intercambio de 15 ml de medio GTVPd6 por frasco
Día 24:	intercambio de 15 ml de medio GTVPd6 por frasco

45 En el día 18-28 todas las células se cosechan por medio del uso de solución de disociación de células (Becton-Dickinson) y se realizan 2 etapas de lavado en PBS que contiene 1 % suero AB humano de acuerdo con procedimientos de operación estándar conocidos por los expertos en el campo Después las células se resuspenden en solución de NaCl fisiológica (0,9 %) para la infusión en el paciente

50 Una pequeña alícuota (1000 células totales) se usa para el control de aseguramiento de la calidad del producto para enumerar el número de células progenitoras VP en el producto final por medio del uso de métodos de detección de células progenitoras vasculares bien definidos que se conocen bien por la persona experta en el campo. La verificación del fenotipo de células progenitoras endoteliales tiene que incluir CD31, vWF, y captación de DiL como es bien conocido para la persona experta en el campo. Varias publicaciones para la detección de células-VP se han publicado en la literatura (Gehling y otros, 2000; Loges y otros, 2004).

Ejemplo experimental: En 1 muestra UCB (cantidad 39 ml; TNC 2,2 x 10⁸; CD34+ 0,9 x10⁶) se generan colonias de células VP como se define con un conteo total de células después de cosechadas entre 1,1-1,9 x10⁶ células. Estas células se criopreservan hasta su uso de acuerdo con procedimientos de operación estándar conocidos por los expertos en el campo.

Medio:

Medio GTVPd3

5 El medio consiste de M199 medio basal suplementado con 10 % suero AB humano (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) o derivados en una concentración final de 5 mmol/l. Las siguientes citocinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente, todas las citocinas han sido proporcionadas por tecnología de células madres Inc. o R&D Systems): factor de crecimiento de células madres (50 ng, SCGF) factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; 50 ng/ml), angiopoyetina-1 (100 ng, R&D-systems), angiopoyetina-2 (100 ng, R&D-systems), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 10 ng/ml), factor de crecimiento tipo insulina (IGF; 10 ng/ml), trombopoyetina (TPO; 25 ng/ml); ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), interleucina-1 β (IL-1, 20 ng/ml), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; 10 pg/ml Immunex Corp., Seattle, WA), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml; Amgen, Thousand Oaks, CA), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), Proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos (200 pg/ml; MIP-I alfa) e interleucina-6 (IL-6; 50 pg/ml). Los suplementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomycin (100 U/ml, Invitrogen), 25 μ M 2-mercaptoetanol-beta (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma).

Medio GTVPd6

20 El medio consiste de medio basal M199 suplementado con 2 % de suero AB humano (Cambrex Inc.), O-acetil-L-carnitina (OALC, Sigma Chemicals) o derivados en una concentración final de 5 mmol/l, Las siguientes citocinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente, todas las citocinas han sido proporcionadas por tecnología de células madres Inc. or R&D Systems): factor de crecimiento de células madres (50 ng, SCGF) factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; 50 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; 10 ng/ml), factor de crecimiento tipo insulina (IGF; 10 ng/ml), trombopoyetina (TPO; 25ng/ml); ligando flt-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), interleucina-1 β (IL-1, 20 ng/ml). Los suplementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomycin (100 U/ml, Invitrogen), 25 μ M 2-mercaptoetanol-beta (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma).

Referencias

30 Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., y otros (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 95,3106-3112.

35 Loges, S., Fehse, B., Brockmann, M. A., Lamszus, K., Butzal, M., Guckenbiehl, M., Schuch, G., Ergun, S., Fischer, U., Zander, A. R., y otros (2004). Identification of the adult human hemangioblast. Stem Cells Dev 13, 229-242.

Miller, J. S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I. R., y Moore, K. A. (1999). Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. Blood 93, 96-106.

Punzel, M., Wissink, S. D., Miller, J. S., Moore, K. A., Lemischka, I. R., y Verfaillie, C. M. (1999). The myeloid-lymphoid initiating cell (ML-IC) assay assesses the fate of multipotent human progenitors in vitro. Blood 93, 3750-3756.

Reivindicaciones

- 5 1. Un medio para el cultivo, la expansión y/o diferenciación de células madres, dicho medio comprende un medio de cultivo de células básico, 1-20 % de suero humano, 2-10 mmol/O-acetil-L-carnitina , 40-80 mg/l de heparina N-desulfatada-N-acetilada y una combinación de citocinas adecuadas, que preferentemente abarca tres o más de trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , y LIF.
- 10 2. Un medio de acuerdo con la reivindicación 1, donde el medio comprende aproximadamente 3-8, con mayor preferencia aproximadamente 5 mmol/l de O-acetil-L-carnitina.
- 15 3. Un medio de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende aproximadamente 50-70, con mayor preferencia aproximadamente 60 mg/l de heparina N-desulfatada-N-acetilada.
- 20 4. Un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para expandir células madres dicho medio comprende un medio para expandir células madres que comprende un medio de cultivo celular básico, 10-20 % de suero humano, 2-10 mmol/l de O-acetil-L-carnitina , 40-80 mg/l de heparina N-desulfatada-N-acetilada y una combinación de citocinas adecuadas que preferentemente abarca tres o más de trombopoyetina ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , y LIF.
- 25 5. Un medio para la expansión de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende aproximadamente 15 % de suero humano, de preferencia suero AB.
- 30 6. Un medio para la expansión de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende aproximadamente 5 mmol/l de O-acetil-L-carnitina.
- 35 7. Un medio para la expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende 60 mg/l heparina N-desulfatada-N-acetilada.
- 40 8. Un medio para la expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-7 en donde el medio básico es RPMI1640.
- 45 9. Un medio para la expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-8, que comprende trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madres, G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , LIF, VEGF, bFGF, IL-3 e IL-7.
- 50 10. Un medio de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 para diferenciar células madres en progenitores de células asesinas naturales, que comprende entre 5-10 % de suero humano
- 55 11. Un medio de acuerdo con la reivindicación 10 en el cual la cantidad de suero es aproximadamente 8 %.
12. Un medio para la diferenciación de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 que comprende aproximadamente 5 mmol/l de O-acetil-L-carnitina.
13. Un medio para la diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende 60 mg/l de heparina N-desulfatada-N-acetilada.
14. Un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde el medio básico es una mezcla de 2:1 (v/v) DMEM y HAM-F12.
15. Un medio inicial de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14 en donde la combinación de citocinas es TPO, FLT-3L, SCF, IL-7, VEGF, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6.
16. Un medio inicial de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde la combinación de citocinas es TPO, FLT-3, SCF, IL-7, IL15, IL-2, GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-I- α e IL-6.

17. Un estuche de partes para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras de NK , que comprende un medio de expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, y un medio de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14.
- 5 18. Un estuche de partes para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras de NK , que comprende un medio de expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, y un medio de diferenciación inicial de acuerdo con la reivindicación 15 y un medio de diferenciación secundario de acuerdo con la reivindicación 16.
- 10 19. Un estuche de partes para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras de NK, que comprende expandir las células madres en un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, diferenciar las células expandidas en un medio de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14.
- 15 20. Un método para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras de NK, que comprende expandir células madres en un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, diferenciar las células expandidas en un medio inicial de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 15 y diferenciar más aun las células resultantes en un medio de diferenciación secundario de acuerdo con la reivindicación 16.
- 20 21. Un método para expandir células madres que comprende cultivar dichas células madres es un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9.
- 25 22. Un método para diferenciar células madres que comprende cultivar células madres, preferentemente células madres expandidas, en células progenitoras de NK en un medio de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14.
- 30 23. Un método para diferenciar células madres que comprende cultivar células madres, preferentemente células madres expandidas, en células progenitoras de NK en un medio inicial de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 15 y diferenciar más aun las células resultantes en un medio secundario de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 16.
- 35 24. Un medio de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para diferenciar células madres en células progenitoras vasculares, que comprende 7-12 %, preferentemente aproximadamente 10 % de suero humano (preferentemente AB).
- 40 25. Un medio de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el medio básico es medio basal M199.
- 45 26. Un medio inicial de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en donde la combinación de citocinas es SCGF, VEGF, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L, IL-1 β , GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1 α e IL-6.
- 50 27. Un medio secundario de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la combinación de citocinas comprende SCGF, VEGF, bFGF, IGF, TPO, FLT-3L e IL-1 β y la cantidad de suero humano es 1-4 %, preferentemente aproximadamente 2 %.
- 55 28. Un método para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras vasculares, que comprende expandir las células madres en un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, diferenciar las células expandidas en un medio de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 24 o 25.
29. Un método para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras vasculares, que comprende expandir células madres en un medio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, diferenciar las células expandidas en un medio inicial de diferenciación de acuerdo con la reivindicación 26 y diferenciar más aun las células resultantes en un medio de diferenciación secundario de acuerdo con la reivindicación 27.
30. Un método para diferenciar células madres que comprende cultivar células madres, preferentemente células madres expandidas, en células progenitoras vasculares en un medio de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-25.
31. Un método para diferenciar células madres que comprende cultivar las células madres, preferentemente células madres expandidas, en células progenitoras vasculares en un medio inicial de diferenciación de acuerdo con la

reivindicación 26 y diferenciar más aun las células resultantes en un medio de diferenciación secundario de acuerdo con la reivindicación 27.

- 5
- 32.** Un estuche de partes para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras vasculares, que comprende un medio de expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, y un medio de diferenciación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24-25.
- 10
- 33.** Un estuche de partes para expandir y diferenciar células madres en células progenitoras vasculares, que comprende un medio de expansión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-9, un medio de diferenciación inicial de acuerdo con la reivindicación 26 y un medio de diferenciación secundario de acuerdo con la reivindicación 27.