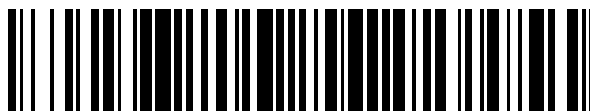


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 205**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013 E 13160782 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2730648**

54 Título: **Medio de cultivo para células madre mesenquimales humanas**

30 Prioridad:

13.11.2012 ES 201231753

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

25.11.2016

73 Titular/es:

GRIFOLS, S.A. (100.0%)

C/ Jesús y María, 6

08022 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

DIEZ CERVANTES, JOSÉ MARIA y

GAJARDO RODRÍGUEZ, RODRIGO

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 591 205 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

Medio de cultivo para células madre mesenquimales humanas

- 5 La presente invención se refiere a un nuevo medio de cultivo para células madre mesenquimales humanas (hMSC). Más en particular, la presente invención se refiere a un medio de cultivo en el que pueden crecer líneas de hMSC, incluso las que no crecen en medios de cultivos habitualmente utilizados para este tipo de células, debido a que se han adaptado a medios de cultivo específicos.
- 10 Las hMSC son células multipotentes, que se caracterizan fundamentalmente por su capacidad de diferenciarse en varios tejidos mesenquimales, tales como hueso, cartílago, tendón, músculo, tejido adiposo, entre otros. Las hMSC pueden ser aisladas de varios tejidos de adultos, entre los que se encuentran la médula ósea, el tejido adiposo y la sangre del cordón umbilical.
- 15 El efecto antiproliferativo, inmunomodulador y antiinflamatorio de las hMSC ha centrado la atención en estas células como potenciales agentes terapéuticos en enfermedades causadas por el sistema inmune, que incluyen la enfermedad injerto contra huésped, el rechazo tras el trasplante de órganos sólidos y las enfermedades autoinmunes.
- 20 Es conocido que, para el cultivo *in vitro* de las hMSC es imperativo preservar su capacidad pluripotencial y, para ello, se requiere la adición de factores exógenos, tales como, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante (TGFβ-1), a los medios de cultivo habituales. Sin embargo, la mayor parte de hMSC son dependientes de un medio de cultivo específico, e incluso no se pueden cultivar en medios que tradicionalmente se han utilizado para el cultivo de células madre mesenquimales, tal como el medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino calificado para células madre mesenquimales (MSCQ).

25 Para superar estos problemas, la presente invención da a conocer un medio de cultivo nuevo para hMSC, sobre el cual pueden crecer las hMSC que no crecen en otras formulaciones de medios de cultivo. El medio de cultivo según la presente invención comprende:

- 30
- a) medio basal utilizado habitualmente para el cultivo de células madre mesenquimales.
 - b) lisado de capa de leucocitos/plaquetas humana (capa leucoplaquetaria ("buffy coat"); LBC)
 - c) insulina
 - 35 d) selenito sódico
 - e) etanolamina
 - f) factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)

40 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio de cultivo" se refiere a una solución de nutrientes para el cultivo, crecimiento o proliferación de las células. La expresión "cultivo celular" se refiere a células que se mantienen, cultivan o hacen crecer en un ambiente *in vitro* artificial.

45 La expresión "medios basales" o "medio basal" utilizada en el presente documento, se refiere a cualquier medio en el que las células mesenquimales humanas son capaces de crecer cuando se suplementan con diferentes suplementos que pueden contener suero o no. Los medios basales suministran sales inorgánicas estándar, tales como zinc, hierro, magnesio, calcio y potasio, así como vitaminas, glucosa, un sistema tampón y aminoácidos esenciales.

50 Preferentemente, el medio basal habitualmente utilizado para el cultivo de células mesenquimales en el medio de cultivo, según la presente invención, es DMEM/F12 + piruvato, siendo el medio DMEM/F12 una mezcla a partes iguales del medio Eagle modificado por Dulbecco ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") (DMEM), que es una modificación del medio mínimo esencial desarrollado por Harry Eagle, y del medio de Ham F12 ("Ham's F12 medium"), desarrollado por Ham para el crecimiento de las células CHO (ovario de hámster chino); F10 de Ham; F12 de Ham; MCDB 131, un medio desarrollado por Knedler y Ham como un medio de suplementación reducida de suero para el crecimiento de células humanas o RPMI 1640, cuya denominación deriva de las iniciales del Roswell Park Memorial Institute, en el que fue desarrollado por Moore y colaboradores para el cultivo de linfocitos normales y neoplásicos, aunque con la suplementación adecuada, pueden crecer otros tipos celulares distintos. La formulación y composición de estos medios es ampliamente conocida y se puede obtener a partir de cualquier productor o proveedor, tal como, por ejemplo, Gibco (Life Technologies). Más preferentemente, el medio es DMEM/F12 + piruvato.

60 Uno de los componentes del medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la presente invención, es el lisado de capa de leucocitos/plaquetas. La capa de leucocitos/plaquetas, también conocida como capa leucoplaquetaria, es la capa que se observa después de la centrifugación o de la sedimentación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos. Está comprendida fundamentalmente por leucocitos y plaquetas. El lisado de capa de leucocitos/plaquetas (capa leucoplaquetaria) está presente en el medio de cultivo, según la presente

invención, en una cantidad comprendida entre el 5 y el 20% (v/v), más preferentemente, entre el 7 y el 15% (v/v), y de la forma más preferente del 10% (v/v).

5 Otro de los componentes del medio de cultivo según la presente invención es la insulina. Es conocido el efecto beneficioso de la insulina sobre el crecimiento celular (Cartwright, T. y Shah, G.P Culture media. Basic cell culture, 2ª edición, Davis, J.M. ed. 2002. Oxford University Press, Nueva York, EE.UU.). En el medio de cultivo, según la presente invención, la insulina está presente, preferentemente, en una cantidad comprendida entre 2 y 20 mg/l, más preferentemente entre 5 y 15 mg/l y de la forma más preferente de 10 mg/l.

10 Además, otro componente del medio de cultivo, según la presente invención, es el selenio, en forma de selenito sódico. El selenio es un elemento traza que normalmente es aportado por el suero al medio de cultivo y que puede ser imprescindible para el mismo. El selenito sódico está presente en el medio de cultivo en una cantidad comprendida entre 0,005 y 1,730 mg/l.

15 Además, el medio de cultivo para células mesenquimales humanas de la presente invención comprende etanolamina. Es conocido que la etanolamina favorece la construcción de las membranas celulares. La etanolamina en el medio de cultivo, según la presente invención, se encuentra en una cantidad comprendida entre 1 y 8 mg/l, preferentemente entre 2 y 5 mg/l.

20 Por último, el medio de cultivo para células mesenquimales, según la presente invención, también comprende bFGF. Es conocido que el bFGF se ha recomendado para el cultivo de células mesenquimales (Sato, J. y otros. Specific cell types and their requirements. Basic cell culture, 2ª edición, Davis, J.M. ed. 2002. Oxford University Press, Nueva York, EE.UU.). El bFGF se encuentra en el medio de cultivo, según la presente invención, en una cantidad comprendida entre 5 y 25 ng/ml.

25 Con la combinación de los componentes del medio de cultivo, según la presente invención, se logra, de forma sorprendente, cultivar líneas celulares mesenquimales humanas, incluso las adaptadas a otros medios de cultivo que, en general, están disponibles comercialmente, que no crecen en los medios de cultivo habitualmente utilizados para este tipo de células, tales como, por ejemplo, las células mesenquimales humanas ofrecidas por Lonza o PromoCell.

30 De forma opcional, el medio de cultivo, según la presente invención, comprende un antibiótico. Se puede utilizar cualquier antibiótico habitualmente utilizado en el cultivo de este tipo de células. Preferentemente, dicho antibiótico es una mezcla de gentamicina/anfotericina. La cantidad de antibiótico que debe utilizarse en el medio de cultivo puede ser determinada con facilidad por un experto en la materia.

35 Para el crecimiento de las células madre mesenquimales, es imprescindible suplementar el medio de cultivo de la presente invención, por ejemplo, con suero fetal bovino (FBS) o suplemento de cultivo celular derivado del plasma humano (SCC), obtenido, por ejemplo, según lo descrito en la patente de EE.UU. 8.252.590 B2. En caso que se utilice FBS, se considera suficiente una cantidad comprendida entre el 10 y el 20% (v/v). Por otra parte, si se utiliza SCC para suplementar el medio de cultivo según la presente invención, se puede considerar suficiente una cantidad comprendida entre el 10 y el 40% (v/v).

40 El medio de cultivo para células madre mesenquimales humanas, según la presente invención, puede estar en forma seca o en forma líquida. Para su utilización en forma seca los componentes del mismo se pueden disolver en un líquido adecuado para el cultivo de las células mesenquimales. El tipo de líquido en el que se pueden disolver los componentes del medio de cultivo, según la presente invención, es conocido por un experto en la materia, tal como, por ejemplo, agua destilada estéril.

50 La presente invención se describe a continuación con más detalle en referencia a varias realizaciones. Estos ejemplos, sin embargo, no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

55 Ejemplo 1.

Se preparó un medio de cultivo, según la presente invención, que contenía DMEM/F12 + piruvato como medio basal, lisado de capa de leucocitos/plaquetas humana (capa leucoplaquetaria) al 10% (v/v), 10 mg/l de insulina, 0,0067 mg/l de selenito sódico, 2 mg/l de etanolamina y 20 ng/ml de bFGF. A dicho medio se le denominó LV2. El medio LV2 se utilizó solo o suplementado con suero fetal bovino (FBS) calificado para células madre mesenquimales (MSCQ) al 10% (v/v) o con suplemento de cultivo celular derivado del plasma humano (SCC) al 15% (v/v). Se cultivaron hMSC disponibles comercialmente de Lonza (Basilea, Suiza) o de PromoCell (Heidelberg, Alemania). Como control positivo se utilizaron los medios de cultivo recomendados por el fabricante. Como control negativo se utilizó solamente un medio basal disponible comercialmente. Los resultados se muestran en la tabla 1.

65

Tabla 1. Resultados experimentales del cultivo de hMSC de Lonza y PromoCell.		
Medio de cultivo	Crecimiento celular	
	hMSC de Lonza	hMSC de Promocell
Recomendado por el fabricante	(+)	(+)
DMEM/F12	(-)	(-)
DMEM/F12 + FBS (MSCQ)	(-)	(-)
DMEM/F12 + SCC	(-)	(-)
LV2	(-)	(-)
LV2 + FBS (MSCQ)	(+)	(+)
LV2 + SCC	(+)	(+)

5 Tal como se puede observar en la tabla 1, las hMSC de Lonza ya no son capaces de crecer cuando se utiliza como medio de cultivo solamente el medio basal DMEM/F12, incluso ni cuando dicho medio basal es suplementado con FBS o SCC. Tampoco crecen cuando se utiliza el medio LV2, según la presente invención, solo. Sin embargo, si fueron capaces de crecer en el medio de cultivo, según la presente invención, cuando éste fue suplementado con FBS o SCC, así como en el medio de cultivo recomendado por el fabricante.

Ejemplo 2.

10 Para determinar el efecto de la combinación de todos los componentes del medio de cultivo, según la presente invención, se preparó un medio de cultivo LV2, tal como se describe en el ejemplo 1 y, adicionalmente, se prepararon varios medios que carecían, como mínimo, de un componente del medio de cultivo, según la presente invención. Los medios preparados, así como los resultados obtenidos, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la eliminación de componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento de hMSC de Lonza y PromoCell.		
Medio de cultivo	Crecimiento celular	
	hMSC de Lonza	hMSC de PromoCell
Recomendado por el fabricante	(+)	(+)
DMEM/F12	(-)	(-)
LV2 + SCC	(+)	(+)
LV2 + SCC sin insulina, selenito sódico y etanolamina	(-)	(-)
LV2 + SCC sin lisado de leucocitos/plaquetas (capa leucoplaquetaria)	(-)	(-)
LV2 + SCC sin bFGF	(-)	(-)
LV2 + SCC sin LBC/bFGF	(-)	(-)

15 Tal como se puede observar en la tabla 2, la hMSC de Lonza y de PromoCell crecieron solamente en el medio de cultivo recomendado por el fabricante y en el medio de cultivo, según la presente invención, suplementado con SCC. Cuando se eliminó, como mínimo, uno de los componentes del medio de cultivo, según la presente invención, las hMSC ya no fueron capaces de crecer en el mismo.

20 Si bien la presente invención se ha descrito con respecto a ejemplos de realizaciones preferentes, éstos no se deben considerar limitativos de la presente invención, que se definirá por la interpretación más amplia de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, que comprende:

- 5 a) medio basal de células madre mesenquimales;
- b) lisado de capa de leucocitos/plaquetas humana (capa leucoplaquetaria) ;
- c) insulina;
- d) selenito sódico;
- 10 e) etanolamina; y
- f) factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)

2. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 1, en el que el medio basal de células madre mesenquimales es DMEM/F12 + piruvato, F10 de Ham, F12 de Ham, MCDB 131 o RPMI 1640.

15 3. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 2, en el que el lisado de capa de leucocitos/plaquetas humana (capa leucoplaquetaria) está presente en el medio de cultivo en una cantidad comprendida entre el 5 y el 20% (v/v).

20 4. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 3, en el que dicho lisado de capa de leucocitos/plaquetas humana (capa leucoplaquetaria) está presente en el medio de cultivo en una cantidad comprendida entre el 7 y el 15% (v/v).

25 5. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 4, en el que la insulina está presente en una cantidad comprendida entre 2 y 20 mg/l.

6. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 5, en el que la insulina está presente en una cantidad comprendida entre 5 y 15 mg/l.

30 7. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 6, en el que el selenito sódico está presente en una cantidad comprendida entre 0,005 y 1,730 mg/l.

8. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 7, en el que la etanolamina está presente en una cantidad comprendida entre 1 y 8 mg/l.

35 9. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 8, en el que la etanolamina está presente en una cantidad comprendida entre 2 y 5 mg/l.

40 10. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 9, en el que el bFGF está presente en una cantidad comprendida entre 5 y 25 ng/ml.

11. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 10, que comprende, además, un antibiótico.

45 12. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 11, en el que el antibiótico es una mezcla de gentamicina/anfotericina.

13. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 12, en el que dicho medio está suplementado con suero fetal bovino (FBS) en una cantidad comprendida entre el 10% y el 20% (v/v).

50 14. Medio de cultivo para células mesenquimales humanas, según la reivindicación 12, en el que dicho medio está suplementado con suplemento de cultivo celular derivado de plasma humano (SCC) en una cantidad comprendida entre el 10% y el 40% (v/v).