

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 937**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2011 PCT/EP2011/052511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2011 E 11704979 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2539441**

54 Título: **Medio de cultivo celular para el crecimiento y diferenciación de células del linaje hematopoyético**

30 Prioridad:

22.02.2010 US 306682 P

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

17.04.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
(33.3%)

4, Place Jussieu

75005 Paris, FR;

ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(33.3%)

72 Inventor/es:

DOUAY, LUC y

GIARRATANA, MARIE-CATHERINE

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 608 937 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 celular para el crecimiento y diferenciación de células del linaje hematopoyético

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un medio de cultivo celular para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético.

10 Antecedentes técnicos

[0002] Existe una alta demanda continuada de productos sanguíneos lábiles, en particular con fines de transfusión, que no se cumple de forma satisfactoria en los suministros actuales de sangre humana natural. En consecuencia, se han explorado numerosos sustitutos a la sangre natural.

15 **[0003]** Sin embargo, las hemoglobinas estabilizadas o recombinantes han mostrado rendimientos decepcionantes, las indicaciones de transportadores de oxígeno artificiales son limitadas y el desarrollo de glóbulos rojos "universales" hechos compatibles con el sistema ABO y/o el antígeno RhD por tratamiento enzimático o enmascaramiento antigénico es lento. Así existe la necesidad de alternativas a estos procedimientos.

20 **[0004]** A este respecto, se han favorecido en especial los intentos de generar células eritroides, tales como glóbulos rojos, a partir de células madre *in vitro*.

25 **[0005]** Sin embargo, supone un reto considerable reproducir *in vitro* lo que lleva varios meses construir *in vivo* en la naturaleza. De hecho, en el curso de su desarrollo en los seres humanos, la eritropoyesis evoluciona desde el mesodermo en dos oleadas. La eritropoyesis primitiva empieza ya en la tercera semana de gestación en el saco vitelino (tejido extraembrionario) y da origen a eritrocitos nucleados primitivos, megaloblásticos, que sintetizan hemoglobina embrionaria del tipo Gower I ($\zeta 2\epsilon 2$) y Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$). La eritropoyesis definitiva empieza durante la quinta semana de gestación en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM), antes de migrar al hígado fetal y después a la médula ósea. Las células eritroides producen las maduras poco a poco, lo que conduce a la producción de glóbulos rojos (GR) enucleados, normocíticos y que contienen hemoglobina fetal ($\alpha 2\gamma 2$) y después adulta ($\alpha 2\beta 2$).

30 **[0006]** Hasta la fecha, se han comunicado varios intentos de producir glóbulos rojos a partir de células madre embrionarias humanas, tales como los descritos por Ma y col. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:13087-13092. Sin embargo, estos experimentos se basan en general en una etapa de cocultivo en presencia de células del estroma, lo que dificulta la ampliación a escala del proceso.

Resumen de la invención

40 **[0007]** La presente invención procede del hallazgo inesperado, por parte de los autores de la invención, de que un medio de cultivo celular que comprende insulina, transferrina y plasma o suero era útil para la producción masiva de glóbulos rojos o reticulocitos a partir de células madre embrionarias humanas, células madre pluripotentes inducidas (MPi) humanas o células madre hematopoyéticas humanas, sin la necesidad de un cocultivo en un estroma celular.

45 **[0008]** Así, la presente invención se refiere a un medio de cultivo celular para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético, que comprende:

- 50 - insulina a una concentración de entre 1 y 50 $\mu\text{g/ml}$;
 - transferrina a una concentración de entre 100 $\mu\text{g/ml}$ a 2.000 $\mu\text{g/ml}$; y
 - plasma o suero a una concentración de entre el 1% y el 30%.

[0009] La presente invención también se refiere al uso de un medio de cultivo celular tal como se define anteriormente, para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético.

55 **[0010]** La presente invención se refiere además a un procedimiento para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético que comprende al menos una etapa de cultivo de células con un medio de cultivo celular tal como se define anteriormente.

Breve descripción de las figuras**[0011]**

- 5 La **Figura 1** muestra la expansión y diferenciación de células eritroides. La amplificación de células CD34⁺ humanas obtenidas por leucaféresis (LK) movilizada por G-CSF y cultivadas en presencia de plasma humano al 5% según un protocolo en tres fases (véase Materiales y procedimientos). Los puntos son los valores medios para cuatro experimentos independientes.
- 10 La **Figura 2** muestra análisis de citometría de flujo de expresión de CD71, CD36, glucoforina A y RhD en el día 18. Los histogramas sombreados representan AMc relevantes y los no sombreados son controles negativos con AMc irrelevantes. Esta figura muestra un experimento representativo de cuatro análisis independientes.
- 15 La **Figura 3** muestra los perfiles de deformabilidad de reticulocitos derivados de LK en el día 18 de cultivo (izquierda) y GR de control (derecha). Se usó ectacitometría en un gradiente osmolar para medir la elongación de los eritrocitos enucleados (véase Materiales y procedimientos). Las curvas definen las variables de osmoscan, es decir, el índice de deformabilidad máximo ($ID_{m\acute{a}x}$) y O_{hiper} y O_{min} , determinadas en condiciones isotónicas, hipertónicas e hipotónicas, respectivamente. Los valores normales de las variables se obtuvieron mediante la prueba de muestras de 144 adultos normales y se clasificaron entre 0,41 y 0,53 para $ID_{m\acute{a}x}$, entre 143 y 163 mOsm/kg para O_{min} y entre 335 y 20 375 mOsm/kg para O_{hiper} .
- 20 La **Figura 4** muestra el estado de hemoglobina de los reticulocitos en el día 18 determinado por análisis HPLC (Bio-Rad Variant II). El porcentaje de hemoglobina en el pico de elución está indicado para las fracciones HbF, HbA1c, HbA2 y HbA total.
- 25 La **Figura 5** muestra las curvas de unión de oxígeno tonométrico a 37°C para una suspensión de reticulocitos (triángulos) y una suspensión de GR de control a diferentes proporciones de DPG/Hb4 en tampón Hepes 10 mM (pH 7,4) que contiene NaCl 150 mM. Las isotermas de GR fueron estimuladas a partir de los parámetros MWC promedio para 10 muestras de sangre diferentes.
- 30 La **Figura 6** muestra una representación esquemática de las etapas de cultivo sucesivas usadas para la producción de células eritroides a partir de CMEh. Se cultivaron grupos de CMEh indiferenciados en "medio de CE" durante 20 días. Los CE disociados del día 15 al día 20 se cultivaron a continuación en un medio líquido durante hasta 28 días en presencia de cócteles en secuencia de citocinas (véase Materiales y procedimientos).
- 35 La **Figura 7** muestra la expresión porcentual de los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34 y CD45/CD34 (eje y izquierdo) de células derivadas de CMEh durante la diferenciación de CE y la cinética de formación de CFC (eje y derecho) en CE del día 6 al día 20 (un experimento representativo).
- 40 La **Figura 8** muestra los marcadores de eritroides CD71, CD36 y GlicoA de células derivadas de CMEh durante la diferenciación de CE.
- 45 La **Figura 9** muestra el compromiso en el linaje eritroide en cultivo líquido. Las partes alícuotas de los cultivos líquidos fueron tomadas en los instantes indicados para el análisis morfológico de las células. Proeritroblastos (ProE); eritroblastos basófilos (BasoE); eritroblastos policromatófilos (PoliE); eritroblastos ortocromáticos (OrtoE); glóbulos rojos cultivados (GRc). Un experimento representativo.
- 50 La **Figura 10** muestra la expresión de antígeno RhD en GRc obtenidos de CVN. Los GRc enucleados generados a partir de cultivo de CE fueron marcados con un anticuerpo anti-Rh D (Biotest, Seraclone[®] Reagents for ABO Blood Typing). Las células se revelan con un anticuerpo anti-humano de conejo conjugado con ficoeritrina secundario (Beckman).
- 55 La **Figura 11** muestra el tamaño de las células eritroides en diversas condiciones de cultivo en el día 25 de cultivo líquido. El tamaño de las células se midió con un micrómetro óptico en 100 células en cada caso. AD (células adherentes); NA (células no adherentes); NA/MS5, NA/CEM, NA/MQ (células no adherentes cocultivadas con células MS5, CEM y macrófagos, respectivamente); SP (GR de sangre periférica adulta).
- 60 La **Figura 12** muestra perfiles de RP-HPLC representativos de cadenas de globina identificadas por espectrometría de masas y análisis HPLC de la Hb, para GRc del día 25 obtenidos de CVN.
- La **Figura 13** muestra perfiles de RP-HPLC representativos de cadenas de globina identificadas por espectrometría de masas y análisis HPLC de la Hb, para GRc del día 24 obtenidos de células sanguíneas del cordón.

La **Figura 14** muestra la cinética de nueva unión a CO después de fotólisis instantánea de hemoglobina de GRc (curvas negras con triángulos) y hemoglobina de GR naturales de control GR (curvas negras con círculos). Las dos muestras revelan propiedades de unión similares, que incluyen la transición alostérica. Al variar la energía del pulso de fotólisis se puede variar la fracción total de hemoglobina disociada y con ello indagar en detalle en las diversas poblaciones unidas parcialmente. Para niveles de fotólisis elevados, se producen más tetrámeros de unión única, que cambian a la conformación desoxi (estado T) y vuelven a unirse a los ligandos más lentamente. En niveles intermedios (medio) se pueden indagar mejor los tetrámeros de unión doble, una forma difícil de estudiar por técnicas de equilibrio. Para niveles de fotólisis suficientemente bajos, el principal fotoproducto es tetrámeros de unión triple que vuelven a unirse a los ligandos rápidamente (estado R). El porcentaje de transición alostérica R -> T se muestra en diferentes intensidades de fotodisociación de CO. La cinética de nueva unión a CO puede simularse usando dos términos exponenciales para la velocidad rápida inherente a las especies tetraméricas en la conformación del estado R y la velocidad lenta inherente a la conformación del estado T. La velocidad del estado R es normalmente de 6×10^6 /ms mientras que la velocidad del estado T es aproximadamente 20 veces más lenta. La fracción de tetrámeros del estado T es muy superior para HbF y Hb de GRc-CVN que para HbA a diferentes intensidades de fotodisociación láser, debido a un desplazamiento de la transición alostérica. El aumento en la transición alostérica a los tetrámeros de estado T de baja afinidad tras la adición de IHP (hexafosfato de inositol) 1 mM es mayor para la HbA que para la HbF y la Hb de GRc-CVN. Este hecho puede explicarse por una menor afinidad de HbF para IHP como ya ha sido comunicado para 2,3 DPG y/o por el porcentaje superior de transición R -> T en ausencia de efector alostérico para la HbF en comparación con la HbA.

Descripción detallada de la invención

[0012] Tal como se entiende en la presente memoria descriptiva la expresión "células del linaje hematopoyético" se refiere a células que se encontrarán en la sangre de mamíferos, en particular de seres humanos, y a células responsables de la producción de dichas células sanguíneas tras la diferenciación. Más en particular, la expresión "células del linaje hematopoyético" según la invención se refiere a células del linaje eritrocítico, es decir, glóbulos rojos (también llamados eritrocitos) y células que son responsables de producir glóbulos rojos tras la diferenciación, ya sea directamente, es decir, en una etapa, o indirectamente, es decir, en varias etapas. Como es bien conocido para el experto en la materia, las células del linaje eritrocítico comprende especialmente, clasificadas por grado creciente de diferenciación, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas (CMH), proeritroblastos, eritroblastos, reticulocitos, células enucleadas, en particular reticulocitos enucleados, y glóbulos rojos. Las células del linaje hematopoyético según la invención comprenden así especialmente células madre, en particular células madre embrionarias (CME), células madre adultas, tales como células madre hematopoyéticas (CMH), células madre pluripotentes inducidas (MPi), así como cuerpos embrioides, pero también proeritroblastos, eritroblastos, reticulocitos y células enucleadas, en particular reticulocitos enucleados. Preferentemente, las células del linaje hematopoyético de la invención son células humanas.

[0013] Las células MPi son bien conocidas para el experto en la materia. Pueden obtenerse por numerosos procedimientos y a partir de numerosos tipos celulares. A modo de ejemplo, las células MPi pueden obtenerse según las enseñanzas de Takahashi & Yamanaka (2006) Cell 126:663-676 y Yamanaka y col. (2007) Nature 448:313-317

[0014] Tal como se entiende en la presente memoria descriptiva, el término "crecimiento" se refiere a la multiplicación de células cultivadas. Tal como se entiende en la presente memoria descriptiva, el término "diferenciación" se refiere a la adquisición por las células cultivadas en un medio de cultivo de características celulares que no están presentes en las células usadas inicialmente para la siembra del medio de cultivo celular. Tal como se entiende en la presente memoria descriptiva "diferenciación" denota especialmente la adquisición de características que sitúan además las células en la vía hacia la diferenciación en glóbulos rojos. Así, el medio de cultivo celular de la invención es útil especialmente para el crecimiento de células indiferenciadas, tales como células madre embrionarias, células madre adultas, tales como células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas (MPi) o cuerpos embrioides, y la diferenciación de las mismas en reticulocitos, células enucleadas o glóbulos rojos.

[0015] Tal como se entiende en la presente memoria descriptiva la expresión "medio de cultivo celular" se refiere a cualquier medio, en particular cualquier medio líquido, responsable de sostener el crecimiento de las células eucarióticas, en particular células de mamífero, más en particular células humanas.

[0016] Preferentemente, el medio de cultivo celular de la invención está compuesto por un medio de cultivo de base al que se añade:

- insulina a una concentración de entre 1 y 50 $\mu\text{g/ml}$;
- transferrina a una concentración de entre 100 $\mu\text{g/ml}$ a 2.000 $\mu\text{g/ml}$; y

- plasma o suero a una concentración de entre el 1% y el 30%.

5 **[0017]** Preferentemente, el medio de cultivo de base es responsable en sí mismo de sostener generalmente el crecimiento de células eucarióticas, en particular de células de mamífero, más en particular de células humanas. Dichos medios de cultivo de base son bien conocidos para el experto en la materia. A modo de ejemplo, se puede citar medio de Dulbecco modificado según Iscove (IMDM) complementado opcionalmente con glutamina o un péptido que contiene glutamina. Así, el medio de cultivo celular según la invención comprende preferentemente además medio de Dulbecco modificado según Iscove (IMDM) complementado opcionalmente con glutamina o un péptido que contiene glutamina.

10 **[0018]** Preferentemente, la insulina según la invención es insulina recombinante humana. Preferentemente también, la insulina está a una concentración de entre 5 µg/ml y 20 µg/ml, más preferentemente a una concentración de entre 8 µg/ml y 12 µg/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml.

15 **[0019]** Preferentemente, la transferrina es transferrina humana. Preferentemente, la transferrina está saturada en hierro. Preferentemente también, la transferrina está a una concentración de entre 200 µg/ml y 1.000 µg/ml, más preferentemente a una concentración de entre 300 µg/ml y 500 µg/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 330 µg/ml o 450 µg/ml. La transferrina puede ser recombinante.

20 **[0020]** Preferentemente el plasma o suero es plasma o suero humano. Preferentemente también, el plasma o suero está a una concentración de entre el 1% y el 20%, más preferentemente a una concentración de entre el 4% y el 12%, más preferentemente todavía a una concentración de entre el 5% y el 10%, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente el 5% o el 10%.

25 **[0021]** En una realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende además heparina, en particular a una concentración 0,5 UI/ml a 5 UI/ml, más en particular a una concentración de entre 1,5 y 3,5 UI/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 2 UI/ml. Preferentemente, el medio de cultivo celular de la invención comprende heparina cuando el suero también está comprendido en el medio de cultivo celular.

30 **[0022]** En otra realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende además eritropoyetina (Epo), en particular eritropoyetina recombinante humana, preferentemente a una concentración de entre 0,5 UI/ml y 20 UI/ml, más preferentemente a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 3 UI/ml.

35 **[0023]** En otra realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende además factor de células madre (FCM), en particular factor de células madre recombinante humano, preferentemente a una concentración de entre 50 ng/ml y 200 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml.

40 **[0024]** En otra realización, el medio de cultivo celular de la invención comprende además interleucina-3 (IL-3), en particular interleucina-3 recombinante humana, preferentemente a una concentración de entre 1 ng/ml y 30 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml, y con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml.

45 **[0025]** En una realización adicional, el medio de cultivo celular según la invención, comprende además hidrocortisona, preferentemente a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M, más preferentemente a una concentración de aproximadamente 10^{-6} M.

50 **[0026]** En otra realización más, el medio de cultivo celular según la invención comprende además al menos un compuesto seleccionado entre:

55 - Trombopoyetina (TPO), en particular trombopoyetina humana recombinante, preferentemente a una concentración de entre 20 ng/ml y 200 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml, con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml;

- Ligando de tirosina-cinasa semejante a FMS 3 (FLT3), en particular ligando FLT3 recombinante humano, preferentemente a una concentración de entre 20 ng/ml y 200 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml, con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 100 ng/ml;

60 - proteína morfogenética ósea 4 (BMP4), en particular proteína morfogenética ósea 4 humana recombinante, preferentemente a una concentración de entre 1 ng/ml y 20 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 8 ng/ml y 12 ng/ml, con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 10 ng/ml;

- factor del crecimiento del endotelio vascular A165 (FCEV-A165), en particular FCEV-A165 humano recombinante,

preferentemente a una concentración de entre 1 ng/ml y 20 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml, con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml; e

- interleucina-6 (IL-6), en particular IL-6 humana recombinante, preferentemente a una concentración de entre 1 ng/ml y 20 ng/ml, más preferentemente a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml, con la máxima preferencia a una concentración de aproximadamente 5 ng/ml.

[0027] Preferentemente, el medio de cultivo celular de la invención se usa para el crecimiento de células madre hematopoyéticas (CMH) y la diferenciación de las CMH en reticulocitos, células enucleadas y/o glóbulos rojos. Preferentemente también, el medio de cultivo celular de la invención se usa para el crecimiento de cuerpos embrioides (CE), en particular obtenidos de células madre embrionarias, y la diferenciación de los CE en reticulocitos, células enucleadas y/o glóbulos rojos. Como resultará evidente para el experto en la materia, los reticulocitos, células enucleadas y/o glóbulos rojos pueden obtenerse como poblaciones celulares sustancialmente puras o como mezclas de reticulocitos, de células enucleadas y/o de glóbulos rojos.

[0028] Preferentemente, el procedimiento de la invención es para la diferenciación de CMH en reticulocitos, células enucleadas, glóbulos rojos o una mezcla de los mismos, y comprende:

- en una primera etapa, cultivo de CMH durante 5 a 9, días, en particular durante 7 días, en un medio de cultivo celular que comprende:

- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
- transferrina a una concentración de entre 300 y 350 µg/ml;
- plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
- heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
- hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
- FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;

- en una segunda etapa, cultivo de las células obtenidas en la primera etapa durante 2 a 5 días, en particular durante 3 a 4 días, en un medio de cultivo celular que comprende:

- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
- transferrina a una concentración de entre 300 y 350 µg/ml;
- plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
- heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
- hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
- FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;

- en una tercera etapa, cultivo de las células obtenidas en la segunda etapa durante 6 a 10 días, en particular hasta el día 18 a 21 a partir del principio de la primera etapa, en un medio de cultivo celular que comprende:

- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
- transferrina a una concentración de entre 300 y 350 µg/ml;
- plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
- heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
- hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;

- obteniendo así reticulocitos, células enucleadas, glóbulos rojos, o una mezcla de los mismos.

[0029] Preferentemente también, el procedimiento de la invención es para la diferenciación de CE en glóbulos rojos, reticulocitos, células enucleadas, o una mezcla de los mismos y comprende:

- en una primera etapa, cultivo de CE durante 15 a 25 días, en particular durante 20 días, en un medio de cultivo celular que comprende:

- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml; transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
- plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
- heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
- FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;

- TPO a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - ligando FLT3 a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - BMP4 a una concentración de entre 8 ng/ml y 12 ng/ml;
 - FCEV-A165 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - 5 - IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - IL-6 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 10 - en una segunda etapa, disociación de las células obtenidas en la primera etapa y cultivo de las células disociadas durante 6 a 10 días, en particular durante 8 días, en un medio de cultivo celular que comprende:
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - 15 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 20 - en una tercera etapa, cultivo de las células obtenidas en la segunda etapa durante 2 a 4 días, en particular durante 3 días, en un medio de cultivo celular que comprende:
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - 25 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 30 - en una cuarta etapa, cultivo de las células obtenidas en la tercera etapa durante 2 a 4 días, en particular durante 3 días, en un medio de cultivo celular que comprende:
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - 35 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 40 - en una quinta etapa, cultivo de las células obtenidas en la tercera etapa durante 8 a 12 días, en particular durante 10 días, (i) en un medio de cultivo celular que comprende:
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - 45 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- o (ii) en una capa de células estromales adherente;
- 50 obteniendo así glóbulos rojos, reticulocitos, células enucleadas, o una mezcla de los mismos.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Producción *in vitro* de reticulocitos a partir de células madre hematopoyéticas

55 **Materiales y procedimientos**

Cultivo celular

- 60 **[0030]** Se obtuvo sangre periférica normal movilizada con G-CSF [células de leucaféresis (LK)] a partir de donantes sanos con consentimiento informado. Se aislaron células CD34⁺ por selección de microperlas supermagnéticas usando columnas Mini-MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Glodbach, Alemania) (pureza > 94 ± 3%).

[0031] Las células se cultivaron en IMDM (medio de Dulbecco modificado según Iscove, Biochrom, Alemania) suplementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia), 330 µg/ml de transferrina humana saturada con hierro, 10 µg/ml de insulina (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia), 2 IU/ml de heparina Choay (Sanofi, Francia) y plasma inactivado con virus de disolvente/detergente (S/D) al 5%. El procedimiento de expansión estaba formado por tres etapas. En la primera etapa (días 0-7), se cultivaron 10^4 /ml de células CD34⁺ en presencia de hidrocortisona (HC) 10^{-6} M (Sigma), 100 ng/ml de FCM (proporcionado amablemente por Amgen, Thousand Oaks, CA), 5 ng/ml de IL-3 (R&D Systems, Abingdon, RU) y 3 IU/ml de Epo (Eprex, proporcionado amablemente por Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, Francia). En el día 4, se diluyó un volumen de cultivo celular en cuatro volúmenes de medio nuevo que contenía HC, FCM, IL-3 y Epo. En la segunda etapa (3-4 días), las células se resuspendieron a 10^5 /ml en medio nuevo suplementado con FCM y Epo. En la tercera etapa (hasta el día 18-21), las células se cultivaron en medio nuevo en presencia de Epo en solitario. Los recuentos celulares se ajustaron a 5×10^5 y $1,5 \times 10^6$ células/ml en los días 11 y 14, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5% en aire y los resultados se presentan en términos de la tasa real de expansión después de la siembra en placa.

[0032] Las células se tiñeron con May-Grunwald-Giemsa y reactivos de nuevo azul de metileno (Sigma), para análisis morfológicos, mientras que las células enucleadas se supervisaron en términos de parámetros hematológicos estándar que incluían VCM (fL), CHCM (%) y HCM (pg/célula) utilizando un XE2100 automat (Sysmex, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza).

Citometría de flujo

[0033] Las células se marcaron con anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o no conjugados. Se usaron anticuerpos para CD71-FITC y CD36-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA), glucoforina A-PE, CD45-FITC y CD34-PE (Beckman Coulter, Marsella, Francia) para el fenotipado. Se empleó un anticuerpo anti-RhD humano primario y un anticuerpo antihumano conjugado con PE de cabra (Beckman Coulter) para determinación de RhD. Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) usando el software Cell Quest.

Medidas de deformabilidad

[0034] Los reticulocitos obtenidos en el día 18 de cultivo se separaron de las células nucleadas por el paso a través de un filtro de desleucocitado (Leucolab LCG2, Macopharma, Tourcoing, Francia) y las células enucleadas se examinaron por ectacitometría, un procedimiento de difracción por láser. En el ectacitómetro (Technicon, Bayer Corp., Diagnostics Division, Tarrytown, NY), las células se suspendieron en solución de polivinilpirrolidona al 4% y se expusieron a un gradiente osmótico creciente (60 a 450 mOsm/kg). Se registró el cambio en el patrón de difracción por láser de las células. La medida fotométrica produce una señal denominada índice de deformabilidad (ID). El análisis de la curva de ID proporciona una medida de la deformabilidad dinámica de la membrana celular en función de la osmolalidad para un esfuerzo de cizalla aplicado constante de 170 dinas/cm². ID_{máx}, expresado en unidades arbitrarias y definido como el valor máximo del ID, está relacionado normalmente con el área superficial media de glóbulos rojos. O_{min} define la osmolalidad para la cual se obtiene un valor mínimo del ID en condiciones hipotónicas y depende de la relación superficie/volumen inicial. O_{hiper} es la osmolalidad para la que el ID reduce a la mitad el valor de ID_{máx} en la región hipertónica de la curva y está relacionado inversamente con la CHCM.

Actividades enzimáticas

[0035] Se añadió digitonina (0,2%) a los eritrocitos obtenidos después del agotamiento de los leucocitos y se cuantificó la Hb por espectrofotometría usando reactivo de Drabkin. Se determinaron las actividades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y piruvato-cinasa mediante la medida de la tasa de aumento en absorbancia de NADPH a 340 nm, usando un espectrofotómetro Synchron CX4 Beckman y reactivos de Randox Laboratories (Crumlin, RU) y Roche Diagnostics, respectivamente. Los resultados se expresaron en unidades por gramo de Hb.

Análisis de Hb

[0036] Las fracciones de Hb se separaron y se cuantificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico. Los análisis se realizaron en sedimentos celulares lavados usando el programa dual Bio-Rad Variant II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante.

Equilibrios de unión a oxígeno en solución

[0037] Las curvas de unión a oxígeno se determinaron por tonometría en un tonómetro de 70 ml con una cubeta anexa de longitud de trayectoria de 1 cm. Las medidas espectrales se realizaron con un espectrofotómetro

Cary 50 y la temperatura se controló con un módulo Peltier. Los análisis se llevaron a cabo a 37°C en bis-Tris 50 mM (pH 7,2) que contenía NaCl 140 mM y glucosa 2 mM. Después de una desoxigenación minuciosa con nitrógeno, se equilibraron las suspensiones de glóbulos rojos a diferentes presiones parciales de oxígeno por inyección de volúmenes conocidos de oxígeno puro en el tonómetro a través de un tapón de caucho usando una jeringa Hamilton. La saturación fraccional se estimó por simulación de los espectros de absorción en las regiones visible y Soret como una combinación lineal de los espectros totalmente desoxigenados y oxigenados de una suspensión de GR, usando una rutina de ajuste de mínimos cuadrados del software Scientist (Micromath Scientific Software, Salt Lake City, UT).

Resultados

1.1. Diferenciación de células madre hematopoyéticas en reticulocitos

[0038] A partir de CMH CD34⁺ obtenidas de la sangre periférica de donantes sanos después de movilización con G-CSF (células LK), se diseñó un protocolo en tres etapas en presencia de plasma inactivado de virus de disolvente/detergente al 5% (plasma S/D). En primer lugar, se indujo la proliferación celular y el compromiso de eritroides con FCM, IL-3 y Epo durante 7 días. En segundo lugar, se amplificó la proliferación de eritroides con FCM y Epo durante 3-4 días. En la tercera etapa, las células se mantuvieron hasta maduración terminal en presencia de Epo en solitario hasta el día 18-21. En el día 18, se obtuvo una meseta con una amplificación media de células CD34⁺ de 66.200 ± 24.000 veces (Figura 1) y en el día 18 el porcentaje de células enucleadas fue del 74 ± 5%. En esta fase, todas las células mostraron características de reticulocitos evaluadas por análisis de flujo de tinte de polimetino (XE2100-Sysmex) y por tinción con nuevo azul de metileno. El volumen celular medio (VCM) fue 141 ± 6 fL, la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) del 30 ± 2% y la hemoglobina celular media (HCM) de 42 ± 1 pg. La caracterización inmunológica de esta población confirmó el perfil de reticulocitos de las células (Figura 2), que expresaron glucoforina A (GPA), CD71 (receptor de transferrina) y CD36 (glucoproteína de plaquetas IV) al 99 ± 1%, el 44 ± 10% y el 11 ± 4% respectivamente.

1.2. Análisis funcional de los reticulocitos generados a partir de células madre hematopoyéticas

[0039] Con el fin de realizar un análisis funcional preciso, los reticulocitos obtenidos en el día 18 de cultivo se separaron de las células nucleadas por el paso a través de un filtro de desleucocitado (Leucolab LCG, Macopharma). Estos reticulocitos tenían un contenido de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) de 65 ± 3 unidades y un nivel de piruvato-cinasa (PK) de 94 ± 7 unidades por gramo de hemoglobina (Hb), en consonancia con la naturaleza de una población joven y homogénea de glóbulos rojos (Jansen y col. Am J Hematol 1985; 20, 203-215). Esto indica que eran capaces de reducir el glutatión y de mantener los niveles de ATP, asegurando así niveles normales de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

[0040] La deformabilidad de las membranas de los reticulocitos se analizó por ectacitometría de barrido osmótico que mide la elongación de los eritrocitos. Esto produce una señal denominada índice de deformabilidad (ID) y la elongación máxima (ID_{máx}) está relacionada con el área superficial media de las células (Clark y col. Blood 1983; 61, 899-910 y Mohandas y col. J Clin Invest 1980; 66, 563-573). La ID_{máx} (0,63) de los reticulocitos, que tenían un mayor volumen medio correspondía a los niveles esperados y confirmó la deformabilidad normal de estas células (Figura 3). Un valor O_{min} inferior a 80 mOsm/kg indicaba una mejor relación superficie/volumen y una disminución de la fragilidad osmótica de los reticulocitos, mientras que el valor normal de O_{hiper} (362 mOsm/kg) confirmaba su hidratación normal. Estos datos muestran que las propiedades reológicas se mantuvieron en los reticulocitos cultivados.

[0041] Los reticulocitos generados *in vitro* contenían hemoglobina A adulta (HbA) (96 ± 0,1%), lo que indicaba un proceso normal de síntesis de Hb en estas condiciones (Figura 4).

[0042] Las medidas de equilibrio de oxígeno tonométrico mostraron que una suspensión de reticulocitos se unía al oxígeno y lo liberaba de la misma forma que una suspensión de GR naturales. La afinidad por el oxígeno (P₅₀) fue de 28 mm Hg para los reticulocitos frente a los 26 ± 1 mm Hg para los GR naturales (Kister y col. J Biol Chem 1987; 262, 12085-12091 y Girard y col. Respir Physiol 1987; 68, 227-238), mientras que los coeficientes de Hill (n₅₀) eran iguales a 2,4 ± 0,1 para las dos muestras. La Figura 5 representa isotermas de unión a oxígeno para diferentes relaciones DPG/Hb4 (de izquierda a derecha: < 0,2; relación normal ≈ 1; 2,4) simuladas a partir de curvas de unión a oxígeno usando parámetros del modelo MWC (Girard y col. Respir Physiol 1987; 68, 227-238). Estos resultados indican que los niveles de 2,3-DPG en los reticulocitos son probablemente próximos a la concentración de tetrameros de Hb, tal como se observa en las tasas de glucólisis de GR naturales. El agotamiento de 2,3-DPG en comparación con una concentración normal reduce el valor de P₅₀ en dos veces, mientras que un aumento en 2,3-DPG después de una incubación prolongada de GR con glucosa 10 mM eleva P₅₀ en aproximadamente el 60%.

Ejemplo de referencia 2: Producción *in vitro* de glóbulos rojos a partir de células madre embrionarias

Materiales y procedimientos*Cultivos de CMEh indiferenciados*

5 **[0043]** La línea de CMEh H1 (National Institute of Health [NIH] código WA01, pasos 23-45) se mantuvo en un estado diferenciado mediante el paso mecánico semanal en nutrientes de células de fibroblasto embrionario de ratón (MEF) primarias tratadas con mitomicina (20 µg/mL; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) en medio Eagle modificado con Dulbecco inactivado (DMEM, Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) suplementado con reponedor de suero inactivado al 20% (Invitrogen) y (rhu)FGF2 humana recombinante (10 ng/mL; Peprotech, Neuilly-sur-Seine, Francia).

Formación de cuerpos embrioides (CE)

15 **[0044]** En el primer día, las CMEh indiferenciadas se trataron con colagenasa IV (1 mg/mL; Invitrogen) y se transfirieron a placas de baja unión (Nunc, Dutscher, Brumath, Francia) para permitir la formación de cuerpos embrioides (CE) durante incubación de toda la noche en medio de diferenciación (DMEM inactivado suplementado con suero bovino fetal inactivado sin calor al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina 1 mM y β-mercaptoetanol 0,1 mM, Invitrogen). Al día siguiente, se suspendió CE en medio líquido de cultivo (MLC) (IMDM-glutamax, Biochrom, Berlin, Alemania) que contenía 450 µg/mL de transferrina humana saturada con hierro (Sigma), 10 µg/ml de insulina (Sigma), plasma humano al 5% y 2 U/ml de heparina, en presencia de FCM, TPO, ligando FLT3 (100 ng/mL), proteína morfogenética ósea rhu 4 (BMP4; 10 ng/mL), rhu FCEV-A165, IL-3, IL-6 (5 ng/mL) (Peprotech) y Epo (3 U/mL) (Eprex, proporcionado amablemente por Janssen-Cilag, Francia) (referido en lo sucesivo como medio). Se cultivaron los CE durante 20 días a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada, con cambios de medio y citocinas cada 2 ó 3 días. Las células se disociaron en una suspensión monocelular por incubación con colagenasa B (0,4 U/mL; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canadá) durante 30 min a 37°C y después tampón de disociación celular (Invitrogen) durante 10 min en un baño de agua a 37°C, seguido por pipeteado suave y paso a través de una malla de 70 µm.

Generación de GRc

30 **[0045]** Día 0 a 8: Se contaron los CE disociados y se sembraron en placa a una densidad de 1×10^6 células/mL en MLC que contenía plasma humano al 10% y 3 U/ml de heparina, en presencia de FCM (100 ng/mL), IL-3 (5 ng/mL) y Epo (3 U/mL). En el día 1, se sembraron por separado las células no adherentes (NA) (4×10^5 /mL) y adherentes (AD) (10^6 /mL) en el mismo medio y citocinas y se cultivaron durante 8 días. En el día 4, se diluyó un volumen de cultivo celular en cuatro volúmenes de medio nuevo que contenía FCM, IL-3 y Epo. Día 8 a 11: Las células se suspendieron a una densidad de 3×10^5 (NA) o 10^5 (AD) células/mL y se cultivaron en medio nuevo suplementado con FCM y Epo. Día 11 a 15: Las células se suspendieron a 10^5 /mL (células NA y AD) y se cultivaron en medio nuevo suplementado con Epo. Día 15 a 25: Las células NA y AD se suspendieron a 2×10^6 células/mL en MLC que contenía plasma humano al 10% y Epo, o se cocultivaron en una capa de células estromales adherente. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en CO₂ al 5% en aire.

Células de estroma

45 **[0046]** Se evaluaron tres fuentes de capas de células adherentes: (i) la línea de células de estroma MS-5, (ii) células del estroma mesenquimatoso (CEM) (Prockop Science 1997; 276, 71-74) establecidas a partir de la médula ósea adulta normal en MEM alfa (Invitrogen) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS) (las CEM adherentes se expandieron y se purificaron a través de al menos dos pasos sucesivos) y (iii) las células del estroma a partir de macrófagos establecidos desde células de médula ósea CD34⁺ en IMDM-glutamax que contenía FCS al 20%, en presencia de FCM (50 ng/mL), FLT3-ligando (30 ng/mL) y TPO (15 ng/mL) durante 10 días y de FCM (30 ng/mL), IL-3 (30 ng/mL) y M-CSF (30 ng/mL) durante una semana. Se usó tinción FACS de las células adherentes para conformar la expresión de CD14 y HLA-DR.

Ensayos de cultivo semisólidos

55 **[0047]** Se sometieron a ensayo progenitoras de BFU-E, CFU-E y CFU-GM en cultivos de metilcelulosa. La concentración de CE disociados fue de 1×10^5 células/mL y las colonias se valoraron en los días 7 y 14 de cultivo.

Análisis de citometría de flujo de CMEh indiferenciadas, CE y células diferenciadas

60 **[0048]** Se prepararon células en PBS que contenía BSA al 0,1% y se marcaron con un cóctel de anticuerpos monoclonales (AMc). Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCalibur con el software de

adquisición CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.). Se usaron los siguientes anticuerpos para el análisis de citometría de flujo de CMEh indiferenciadas, recogidos desagregados en los días 2 a 20 de CE y células eritroides durante la diferenciación: SSEA4-PE (ficoeritrina) y SSEA1-PE (Clinisciences, Montrouge, Francia); TRA-1-60, TRA-1-81, IgM-PE anti-ratón de cabra y IgG-PE anti-ratón de cabra (Chemicon, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia); CD34-PE, CD45-PE, CD45-PC7, CD117-PE, CD71-FITC, CD36-FITC y CD235a-PE (glucoforina A) (Beckman Coulter-Immunotech, Marsella, Francia); CD133-PE (Miltenyi Biotech, Glodbach, Alemania). Se activaron las células viables para análisis y se usó tinción con AMc de control adaptados a los isotipos apropiados para establecer umbrales de tinción positiva y de sustrato.

10 *Composición de hemoglobina de GRc por cromatografía y espectrometría de masas*

[0049] Se midió el porcentaje de las diversas fracciones de hemoglobina por CE-HPLC usando un analizador de Hb Bio-Rad Variant II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). La separación de las diferentes cadenas de globina contenía en los GRc obtenidos de células madre embrionarias humanas en D15 y D25 de cultivo se realizó por cromatografía líquida de fase inversa (RP-LC) y análisis espectral. Los análisis RP-LC se realizaron en C4 Uptisphere (perlas de sílice 5 µm; tamaño medio del poro 300 Å) (Interchim, Montluçon, Francia) (4,6 x 250 mm). La elución se obtuvo por un sistema de dos disolventes (A: CH₃CN al 10% (acetonitrilo) en TFA al 0,3% (ácido trifluoroacético), y B: CH₃CN al 70% en TFA al 0,3%). La integración de los diferentes picos de RP-LC permitió determinar los porcentajes de área de cada fracción aislada de cadena de globinas. Su identificación y su caracterización se realizaron por ionización de electropulverización-espectrometría de masas (ESI-MS) después de separación y recogida de las cadenas de globina. Los resultados se compararon con datos obtenidos con GRc generados a partir de células sanguíneas del cordón umbilical CD34⁺ humanas.

25 *Funcionalidad de hemoglobina de GRc*

[0050] La unión de hemoglobina (Hb) con monóxido de carbono se estudió por fotólisis instantánea usando una cubeta óptica de 4 x 10 mm (4 mm para la luz transmitida y 10 mm para el haz de láser). Brevemente, la cinética de nueva unión de CO a los tetrámeros de Hb se analizó a 436 nm después de la fotodisociación del ligando con un pulso de 10 ns a 532 nm (Marden y col. Biochemistry 1988; 27, 1659-1664). Los GR se lisaron en una solución tampón hipotónica en hielo durante 30 min. Después de centrifugado a 15.000 g, se extrajo el sobrenadante que contenía la Hb de las membranas y los residuos celulares y se añadió IHP (hexafosfato de inositol 1 mM) a las muestras de Hb. Las simulaciones de datos se efectuaron usando el programa de mínimos cuadrados no lineal de Scientist (Micromath).

35 **Resultados**

2.1. Diferenciación de CMEh en CEh acondicionados para establecimiento de compromiso eritroide del medio de cultivo para CE

[0051] La vía eritropoyética se indujo y se estimuló de forma muy temprana. Si bien la adición de BMP4 parecía indispensable (Chadwick y col. Blood 2003; 102, 906-915) y análogamente para FCEV-A165 (Cerdan y col. Blood 2004; 103, 2504-2512), se realizaron ocho experimentos diferentes para probar el papel esencial de otros dos parámetros, citocinas y el tipo de suero. Después de realizar estos experimentos, se definió un medio de cultivo para CE (referido como medio CE) que acondicionaba el compromiso de eritroides. Contiene reserva de plasma humano al 5%, una alta concentración de transferrina (450 µg/mL) y un cóctel de 8 citocinas: FCM, TPO, ligando FLT3 (100 ng/mL), BMP4 rhu (10 ng/mL), FCEV-A165 rhu, IL-3, IL-6 (5 ng/mL) y Epo (3 U/mL). Tal como se describe en las secciones siguientes, estas condiciones de cultivo permitieron obtener al final del cultivo un número máximo de GR enucleados maduros.

50 **2.2. Determinación del potencial eritroide de CEh**

[0052] En primer lugar, se identificó la fase o fases de diferenciación de CEh que tenían el mejor potencial eritroide. Se analizó la cinética de diferenciación de CEh entre los días 2 y 20 de cultivo después de (1) la expresión de marcadores específicos de hematopoyesis y eritropoyesis por citometría de flujo y (2) la formación de progenitores eritroides. Antes de la diferenciación, las CMEh expresaron altos niveles de marcadores específicos para células indiferenciadas y niveles bajos o inexistentes de marcadores hematopoyéticos. La expresión de estos marcadores de células indiferenciadas disminuyó progresivamente hasta el día 13 para permanecer débilmente positiva hasta el día 20. CD34 se expresó del día 2 al 20 con un pico entre los días 9 y 13 y CD45 del día 6 al 20 con un pico en el día 13 (Figura 7). De forma interesante, el receptor de transferrina CD71 se expresó durante todo el cultivo y con un nivel elevado entre los días 6 y 20. Los marcadores eritroides CD36 y CD235a tuvieron una expresión débil desde el día 13 (Figura 8). En general, entre los días 15 y 20, CEh expresó de forma significativa los marcadores hematopoyético y eritroide estudiados: CD45, CD34, CD71, CD36 y CD235a. Entre tanto, el número de

CFC se mantuvo bajo con un ligero pico en el día 15, lo que apunta a un débil potencial clonogénico de CEh (Figura 7). A la vista de estos resultados, se prosiguió con la diferenciación de eritroides usando CEh desde los días 15 y 20 de cultivo.

5 2.3. Diferenciación/maduración de CEh en GRc - Protocolo para la generación de GRc

[0053] Los autores de la invención desarrollaron condiciones de cultivo simples y óptimas consistentes en un medio líquido en presencia de plasma humano al 10% y un cóctel de evolución de citocinas basado en FCM, IL-3 y Epo (Figura 6). En la última fase de cultivo en el día 15, se probó el impacto en la enucleación de tres estromas diferentes conocidos por su capacidad para soportar la hematopoyesis: células MS5 de origen murino, células madre mesenquimatosas (CEM) y macrófagos de origen humano con respecto a condiciones sin estroma. Se disociaron los CEh de los días 15 y 20 de cultivo y las células se resuspendieron y se cultivaron según el protocolo de cultivo líquido para diferenciación/maduración eritroblástica. En el día 1 pudieron distinguirse dos tipos de células, no adherentes (NA) y adherentes (AD), que representaban el 10% y el 90% de las células totales. Los dos tipos de células se cultivaron en paralelo usando el mismo protocolo. Se evaluó la maduración de los eritrocitos de forma regular según la morfología celular después de tinción con MGG y se determinó la expresión de antígenos de membrana de eritroides por citometría de flujo.

20 2.4. Generación de GRc enucleados maduros a partir de CEh desde el día 15 ó 20

[0054] El compromiso eritroide de los CEh de los días 15 ó 20 estuvo completo después de 4 días de cultivo líquido con producción de más del 95% de eritroblastos. La diferenciación/maduración terminal se consiguió progresivamente con la aparición de células enucleadas al $3 \pm 2\%$ en el día 11, al $17 \pm 4\%$ en el día 15, al $31 \pm 8\%$ en el día 18 y al $48 \pm 9\%$ en el día 21. Al final del cultivo en el día 25, la población contenía el $58 \pm 2\%$ de GR perfectamente enucleados (Figura 9). Los niveles de enucleación eran totalmente comparables con independencia de las células cultivadas (NA o AD), las condiciones de cultivo (con o sin estroma) o la naturaleza del estroma (MS5, CEM o macrófagos). Las células eritroides producidas a partir de CEh del día 15 ó 20 fueron capaces de generar GRc y se llamaron "células ventana de enucleación" (CVN). La única diferencia notable durante esta fase de cultivo líquido fue que la amplificación de células NA fue superior a la de células AD (de 24 a 61 veces frente a de 4 a 5 veces en el día 20, respectivamente). Así, a partir de 10^6 células obtenidas de CEh, se generaron 144×10^6 células eritroides, o 82×10^6 GRc.

25 2.5. Análisis de los GRc generados a partir de CVN - Marcadores de membrana de GRc maduros

[0055] El análisis de citometría de flujo de los antígenos de membrana de los GRc producidos atestiguó su grado de madurez. Al final del cultivo, todos los GRc generados expresaron intensamente CD235a y CD71. La expresión de CD36 se redujo con el aumento de la madurez celular ($5\% \pm 1$ en el día 11 frente a $7 \pm 3\%$ en el día 25), mientras que una expresión elevada de antígeno RhD en más del 80% de las células confirmó el alto nivel de maduración de membrana de los GRc (Figura 10).

40 2.6. Tamaño de los GRc

[0056] Al final del cultivo líquido en el día 25, se midió el tamaño de los GRc por microscopia y se comparó con el de los GR adultos de control de la sangre periférica. En ausencia de estroma o después de cocultivo en células MS5, CEM o macrófagos, el tamaño de los GRc era comparable, con un diámetro medio de $10 \mu\text{m}$ (Figura 11).

45 2.7. Análisis de la hemoglobina de los GRc

[0057] Para analizar el tipo de hemoglobina sintetizado por los GRc, se combinó un estudio de las cadenas de globina por HPLC de fase inversa y espectrometría de masas con la identificación de hemoglobina tetramérica por HPLC.

50 *Identificación y cuantificación de las cadenas de globina en GRc por RP-LC y espectrometría de masas*

[0058] La separación de las cadenas de globina por RP-LC permitió la cuantificación de la producción de hemoglobina de los GRc: del 1 al 5% de cadenas beta, del 19 a al 29% de cadenas gamma-G, del 36 al 43% de cadenas alfa y del 11 al 21% cadenas gamma-A. Se observaron también dos picos adicionales de intensidad variable en diferentes experimentos, comprendidos desde ausencia a menos del 15%, y correspondían a las cadenas embrionarias epsilon y zeta. Así, se produjo una síntesis en gran medida predominante de cadenas fetales (del 35 al 50%), una producción débil de cadenas adultas (2%) y una síntesis variable de cadenas embrionarias (< 10%), con aproximadamente el 40% de cadenas alfa. Estos resultados fueron confirmados por identificación

mediante espectrometría de masas de las fracciones eluidas por RP-LC y eran idénticos a los obtenidos para GRc obtenidos de CMH CD34⁺ a partir de sangre del cordón (Figuras 12 y 13).

Estudio de la síntesis de hemoglobina por CE-HPLC

5 **[0059]** Un análisis de Hb tetramérica por CE-HPLC mostró la síntesis del 2,5% de HbA y del 74 al 80% de HbF y los perfiles eran superponibles con los obtenidos para los GRc derivados de CMH CD34⁺ de sangre del cordón (Figuras 12 y 13). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de los autores de la invención usando RP-LC y espectrometría de masas y muestran por primera vez la síntesis de hemoglobina fetal en su forma tetramérica
10 en GRc obtenidos de CMEh.

2.8. Funcionalidad de la hemoglobina de los GRc

15 **[0060]** La funcionalidad de la hemoglobina de los GRc se valoró por cinética de unión a ligandos después de fotólisis instantánea (Figura 14). La cinética bimolecular después de fotodisociación de CO proporciona una sonda sensible de la función de la hemoglobina. Así, se observan dos fases que corresponden a los dos estados cuaternarios de la hemoglobina para unión a ligandos. El componente rápido procede de los tetrámeros en el estado R y el componente lento de los tetrámeros en el estado T. A altos niveles de fotodisociación las especies principales tienen ligandos únicos y dobles, mientras que para niveles bajos se mide principalmente la unión a CO en especies
20 con tres ligandos. Por tanto, el equilibrio alostérico para las diferentes especies con ligandos parciales puede sondearse modificando el nivel de fotodisociación. La transición R->T en HbA normal tiene lugar después de la unión de un segundo ligando al tetrámero de Hb. En presencia de un efector alostérico tal como IHP, el punto de inversión tiene lugar más tarde y las afinidades intrínsecas R y T también disminuyen. La cinética de nueva unión a CO para la hemoglobina de los GRc (Figura 14) fue casi superponible con la de una muestra de sangre fetal, tal como se
25 esperaba a partir del análisis de HPLC que mostraba una gran cantidad de HbF en los GRc. Después de la adición de IHP, la transición R->T se desplazó hacia los tetrámeros de baja afinidad en una magnitud similar que en la sangre fetal (misma magnitud de la fase de nueva unión de estado T lenta). Los experimentos de fotólisis instantánea de CO confirmaron así que la HbF en los GRc es funcional no sólo en condiciones fisiológicas sino también en respuesta a un efector alostérico potente.
30

REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo celular para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético, que comprende:
- 5
- insulina a una concentración de entre 1 y 50 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 100 µg/ml y 2.000 µg/ml;
 - plasma o suero a una concentración de entre el 1% y el 30%;
 - heparina, a una concentración de 0,5 UI/ml a 5 UI/ml;
- 10 - Epo;
- y que opcionalmente comprende además:
- hidrocortisona;
 - o
 - FCM;
 - o
 - FCM e IL-3;
 - o
 - hidrocortisona y FCM;
 - o
 - hidrocortisona, FCM e IL-3;
 - o
 - FCM, TPO, FLT3, BMP4, FCEV-A165, IL-3 e IL-6.
- 15
- 20
- 25
2. El medio de cultivo celular según la reivindicación 1, en el que la insulina está a una concentración de 8 a 12 µg/ml.
3. El medio de cultivo celular según la reivindicación 1 ó 2, en el que la transferrina está a una
- 30 concentración de entre 300 y 500 µg/ml.
4. El medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el plasma o suero está a una concentración de entre el 4 y el 12%.
- 35
5. El medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la heparina está a una concentración de entre 1,5 y 3,5 UI/ml.
6. El medio de cultivo celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende medio de Dulbecco modificado según Iscove complementado opcionalmente con glutamina o un péptido que contiene
- 40 glutamina.
7. El uso de un medio de cultivo celular tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético en ausencia de células nutrientes.
- 45
8. El uso según la reivindicación 7, para el crecimiento de células madre hematopoyéticas (CMH) y la diferenciación de las CMH en reticulocitos, células enucleadas y/o glóbulos rojos.
9. El uso según la reivindicación 8, para el crecimiento de cuerpos embrioides (CE) y diferenciación de los CE en reticulocitos, células enucleadas y/o glóbulos rojos, en ausencia de células nutrientes.
- 50
10. Un procedimiento para el crecimiento y/o diferenciación de células del linaje hematopoyético en ausencia de células nutrientes que comprende al menos una etapa de cultivo de células con un medio de cultivo celular tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 55
11. El procedimiento según la reivindicación 10, para la diferenciación de células madre hematopoyéticas (CMH) en reticulocitos, que comprende:
- en una primera etapa, cultivo de CMH durante 7 días en un medio de cultivo celular que comprende:
- 60
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
 - transferrina a una concentración de entre 300 y 350 µg/ml;
 - plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;

- heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
 - hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
- 5 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- en una segunda etapa, cultivo de las células obtenidas en la primera etapa durante 3 a 4 días en un medio de cultivo celular que comprende:
- 10 - insulina a una concentración de 8 a 12 $\mu\text{g/ml}$;
- transferrina a una concentración de entre 300 y 350 $\mu\text{g/ml}$;
 - plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
 - heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
 - hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
- 15 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- en una tercera etapa, cultivo de las células obtenidas en la segunda etapa hasta el día 18 a 21 a partir del principio de la primera etapa, en un medio de cultivo celular que comprende:
- 20 - insulina a una concentración de 8 a 12 $\mu\text{g/ml}$;
- transferrina a una concentración de entre 300 y 350 $\mu\text{g/ml}$;
 - plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
 - heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
- 25 - hidrocortisona a una concentración de entre $5 \cdot 10^{-7}$ y $5 \cdot 10^{-6}$ M;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- obteniendo así reticulocitos.
- 30 12. El procedimiento según la reivindicación 10, para la diferenciación de cuerpos embrioides (CE) en glóbulos rojos que comprende:
- en una primera etapa, cultivo de CE durante 20 días en un medio de cultivo celular que comprende:
- 35 - insulina a una concentración de 8 a 12 $\mu\text{g/ml}$;
- transferrina a una concentración de entre 425 y 475 $\mu\text{g/ml}$;
 - plasma a una concentración de entre el 3% y el 7%;
 - heparina a una concentración de entre 1,5 UI/ml y 2,5 UI/ml;
 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- 40 - TPO a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- ligando FLT3 a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
 - BMP4 a una concentración de entre 8 ng/ml y 12 ng/ml;
 - FCEV-A165 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
- 45 - IL-6 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
- Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- en una segunda etapa, disociación de las células obtenidas en la primera etapa y cultivo de las células disociadas durante 8 días en un medio de cultivo celular que comprende:
- 50 - insulina a una concentración de 8 a 12 $\mu\text{g/ml}$;
- transferrina a una concentración de entre 425 y 475 $\mu\text{g/ml}$;
 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
- 55 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- IL-3 a una concentración de entre 4 ng/ml y 6 ng/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- en una tercera etapa, cultivo de las células obtenidas en la segunda etapa durante 3 días, en un medio de cultivo celular que comprende:
- 60 - insulina a una concentración de 8 a 12 $\mu\text{g/ml}$;

- transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - FCM a una concentración de entre 80 ng/ml y 120 ng/ml;
- 5 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- en una cuarta etapa, cultivo de las células obtenidas en la tercera etapa durante 3 días, en un medio de cultivo celular que comprende:
- 10 - insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
- transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
 - plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 15 - en una quinta etapa, cultivo de las células obtenidas en la cuarta etapa durante 10 días, (i) en un medio de cultivo celular que comprende:
- insulina a una concentración de 8 a 12 µg/ml;
- 20 - transferrina a una concentración de entre 425 y 475 µg/ml;
- plasma a una concentración de entre el 8% y el 12%;
 - heparina a una concentración de entre 2,5 UI/ml y 3,5 UI/ml;
 - Epo a una concentración de entre 2,5 y 3,5 UI/ml;
- 25 o (ii) en una capa de células estromales adherente;
- obteniendo así glóbulos rojos.

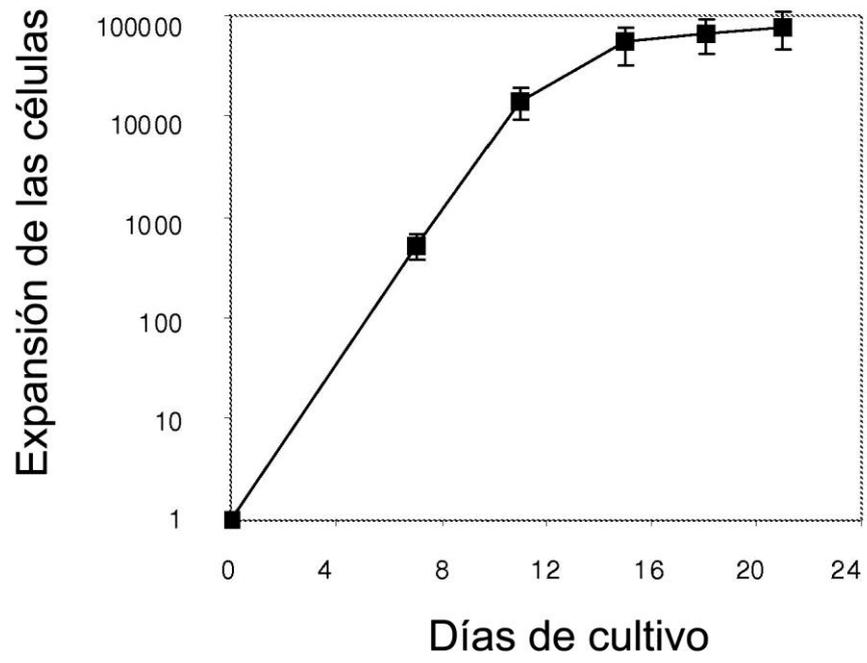


FIG.1

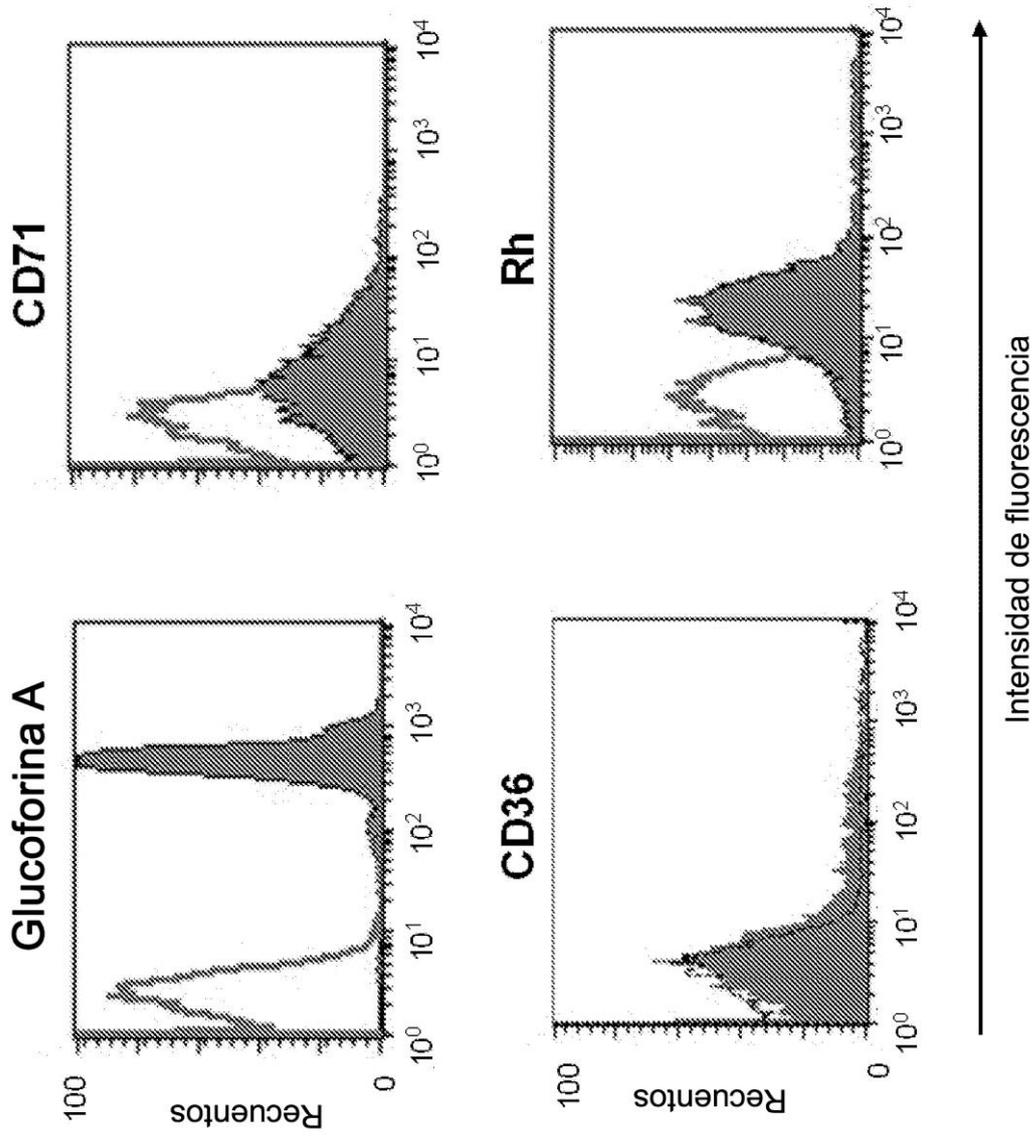


FIG.2

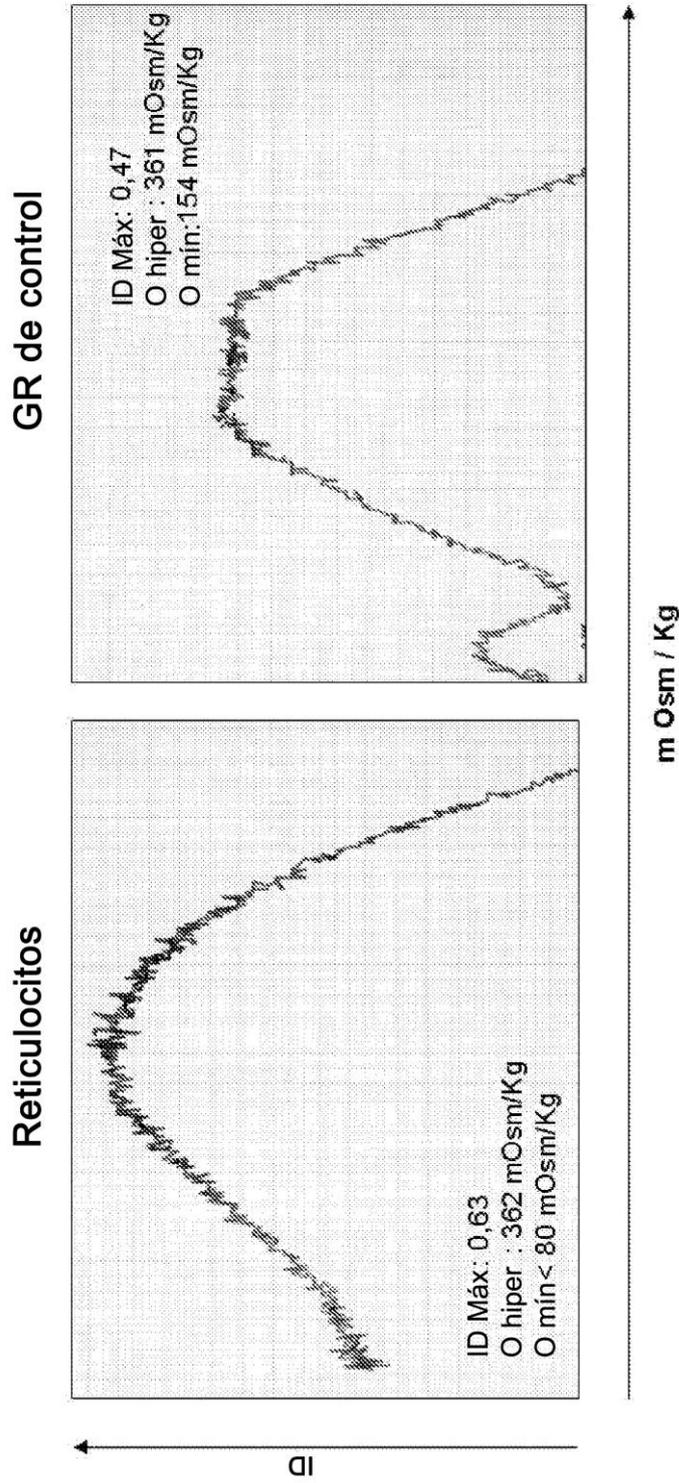


FIG.3

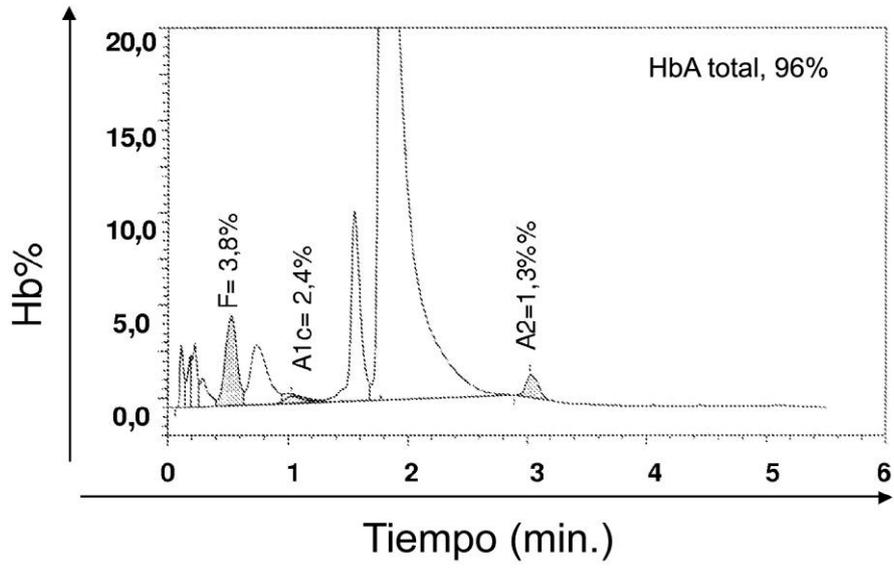


FIG.4

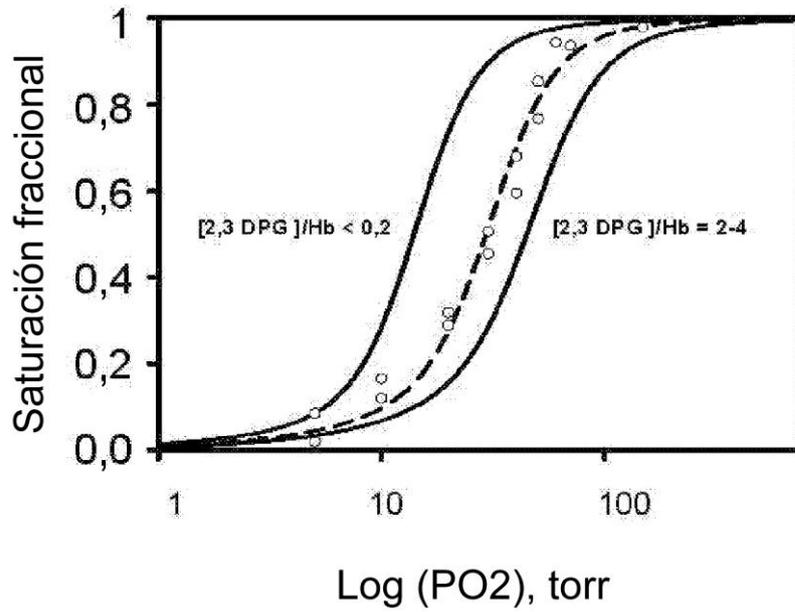


FIG.5

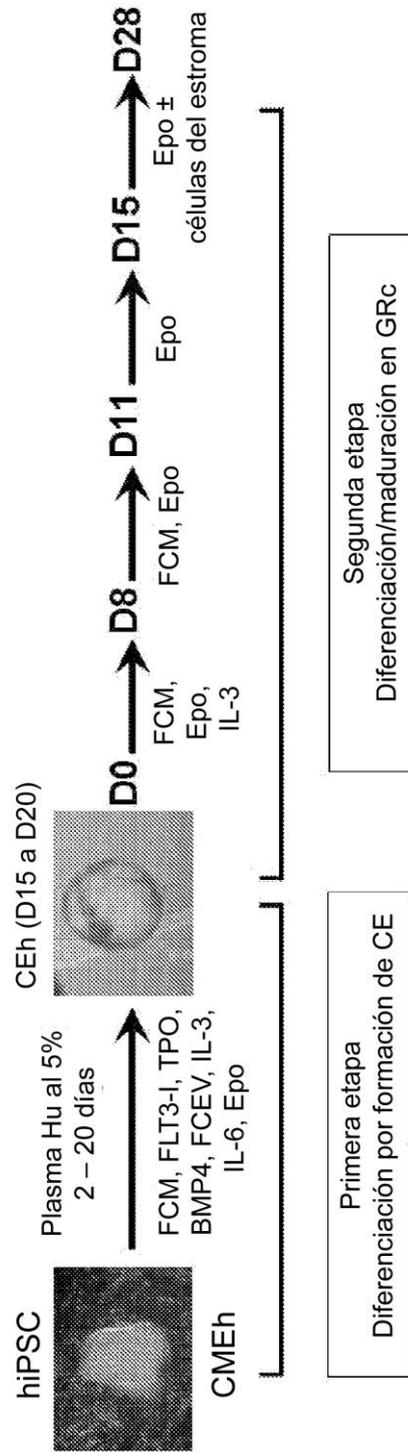


FIG.6

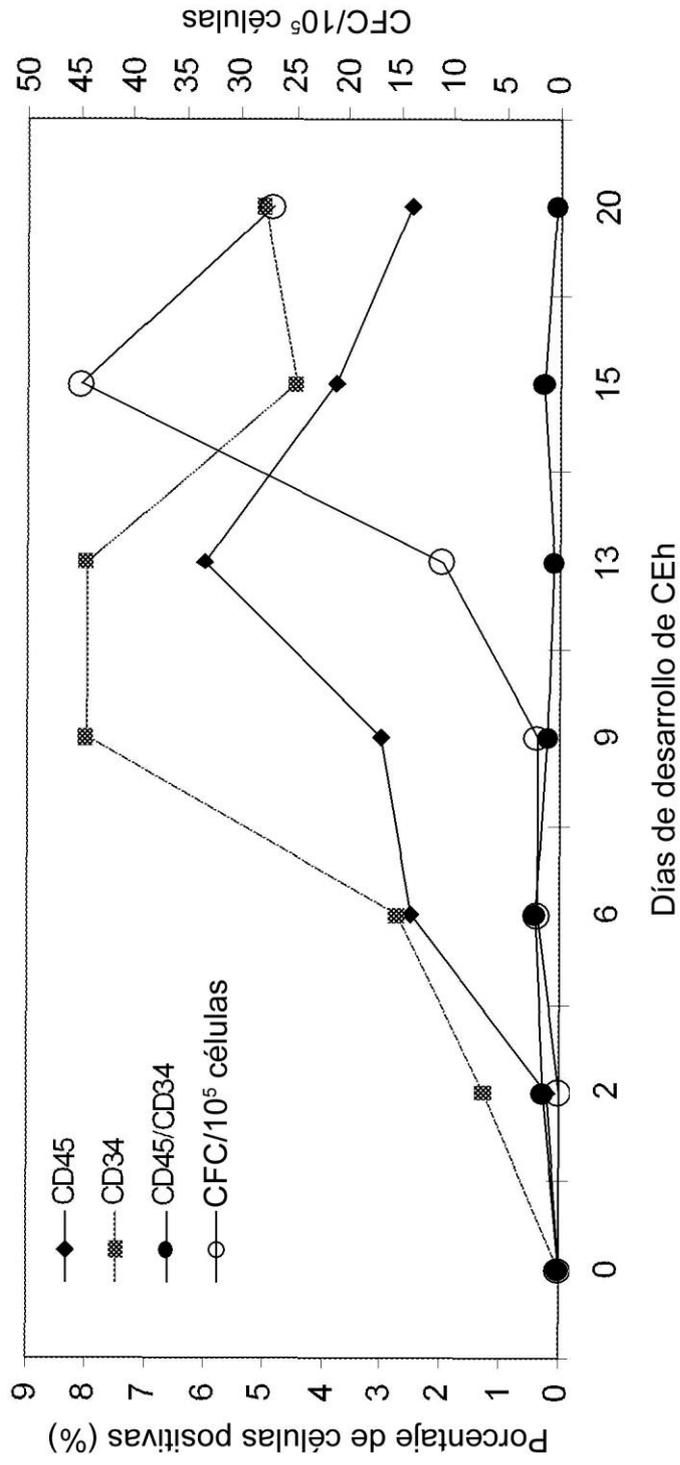


FIG.7

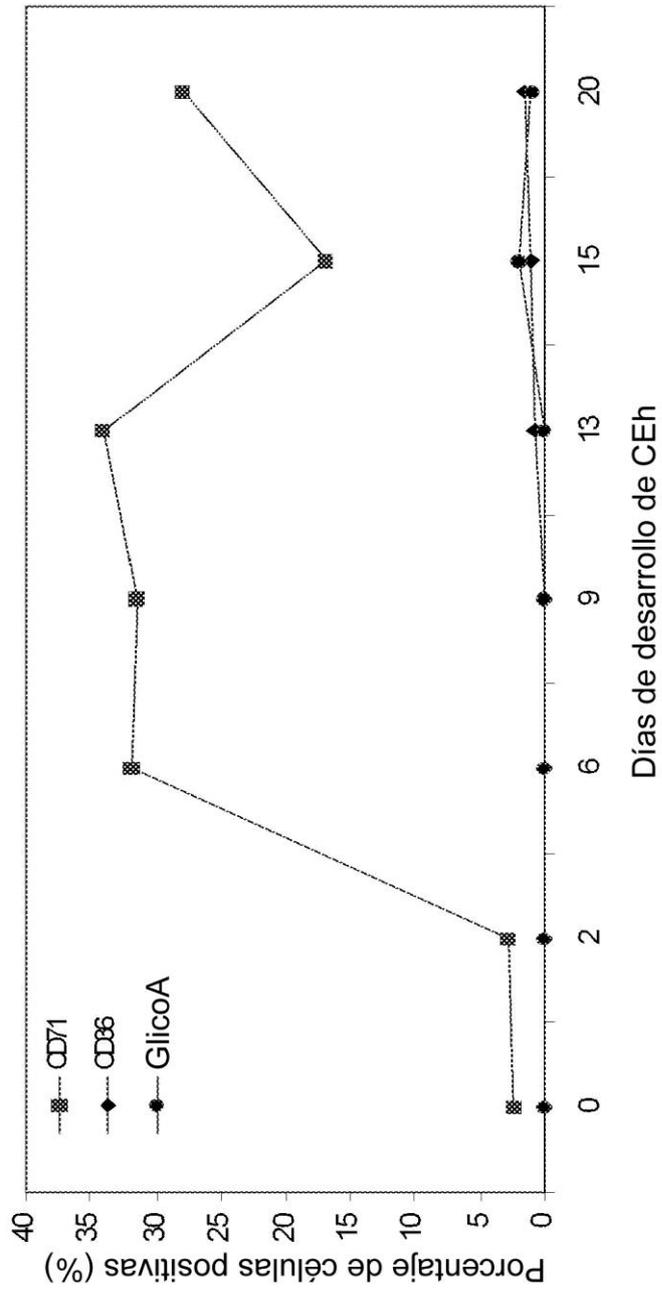


FIG.8

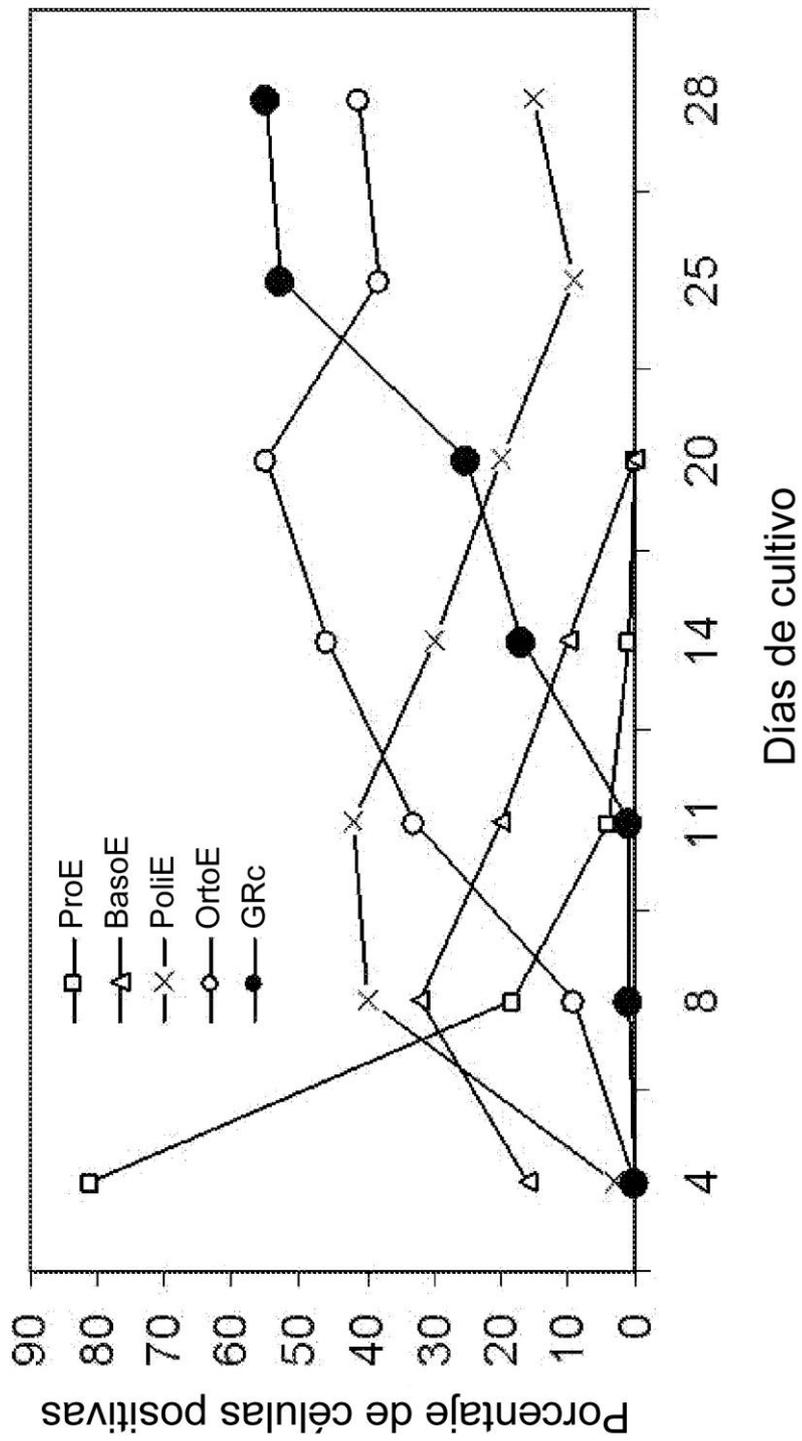


FIG.9

CVN cultivadas

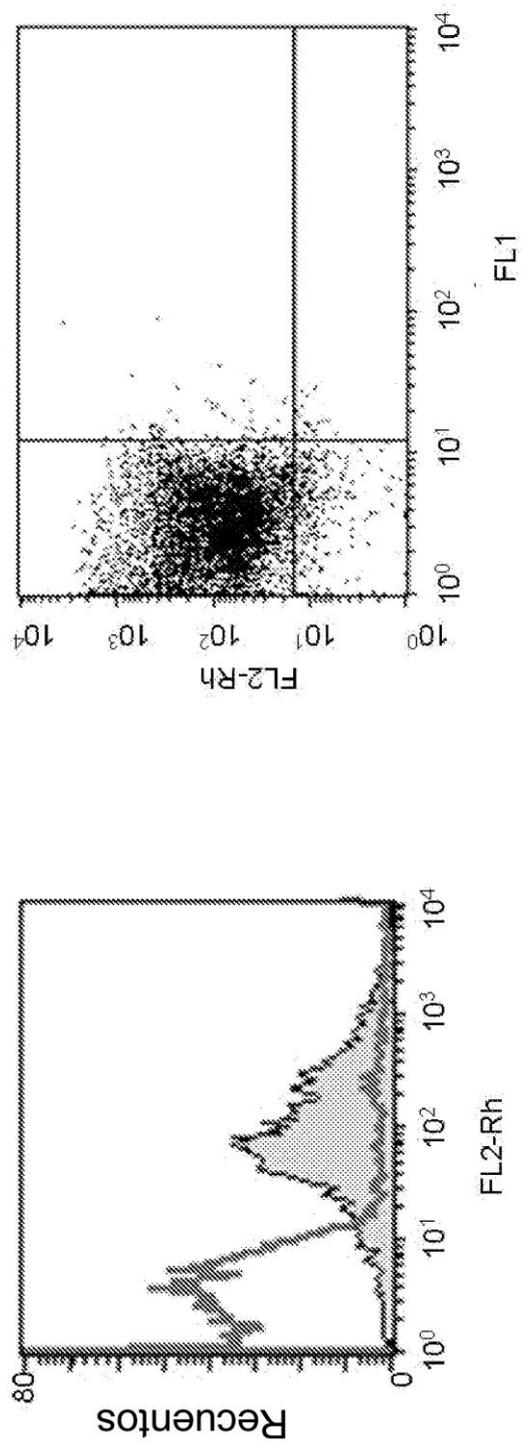


FIG.10

Tamaño de células eritroides

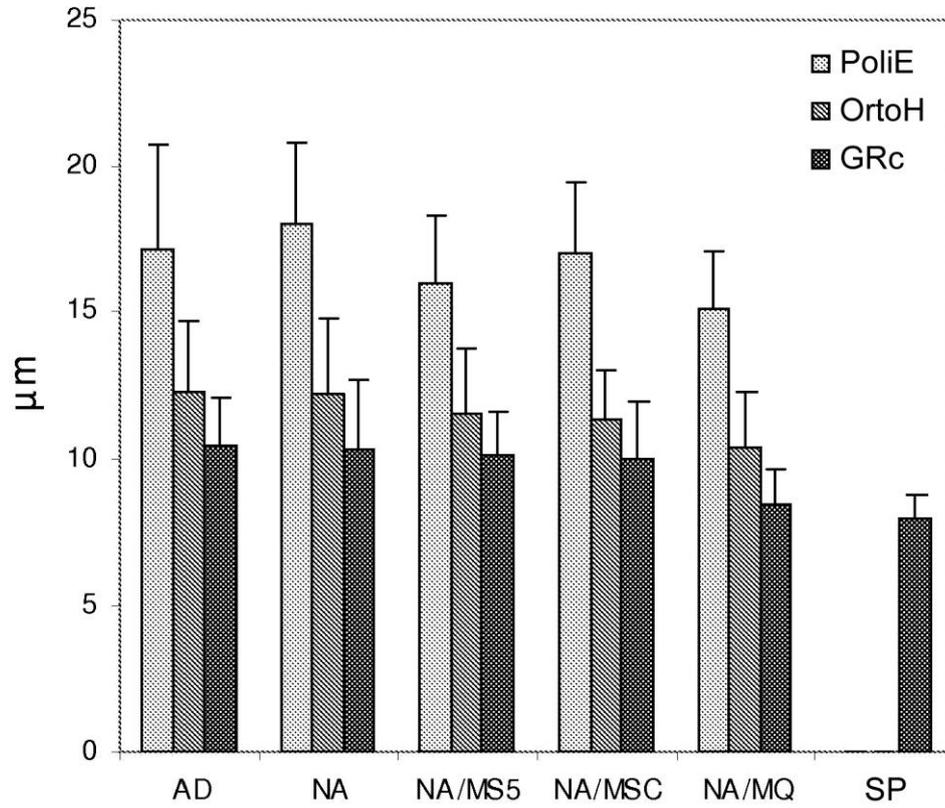


FIG.11

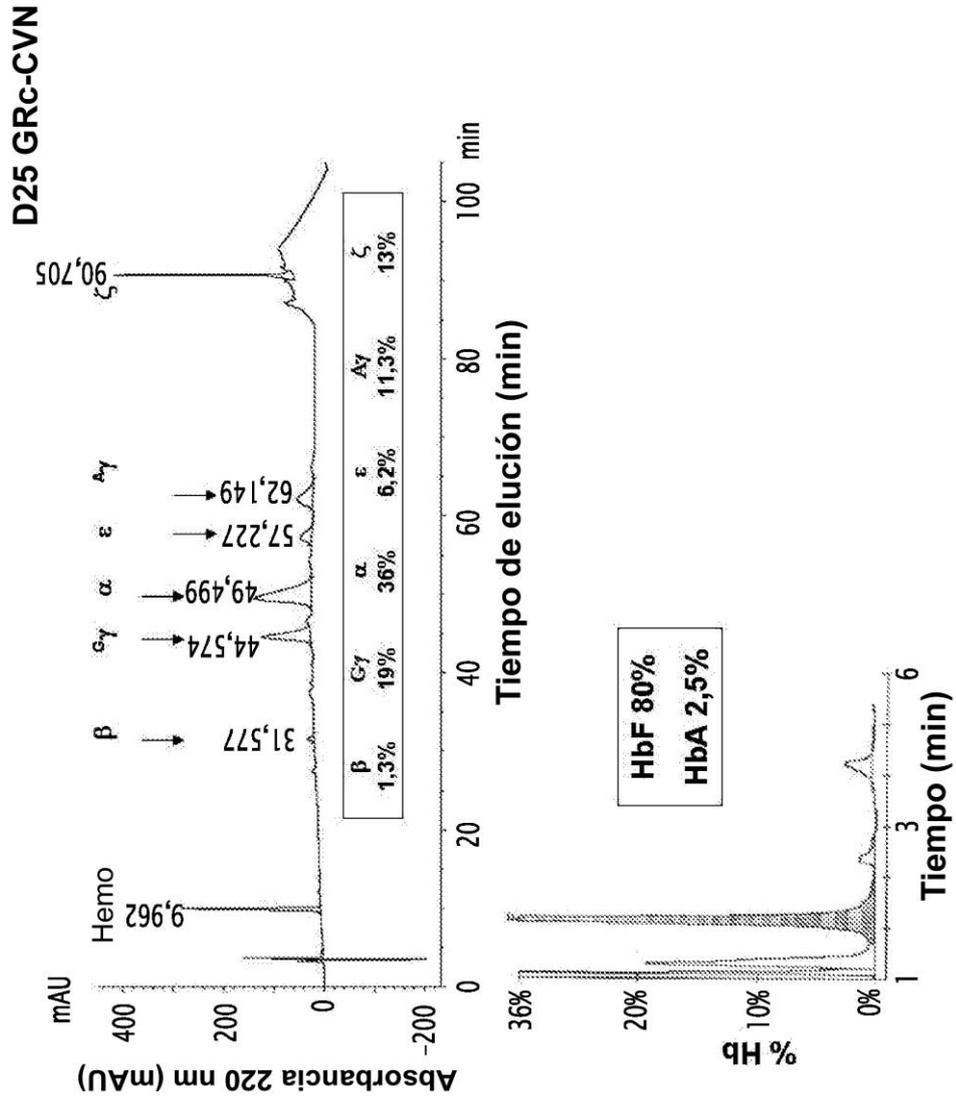


FIG.12

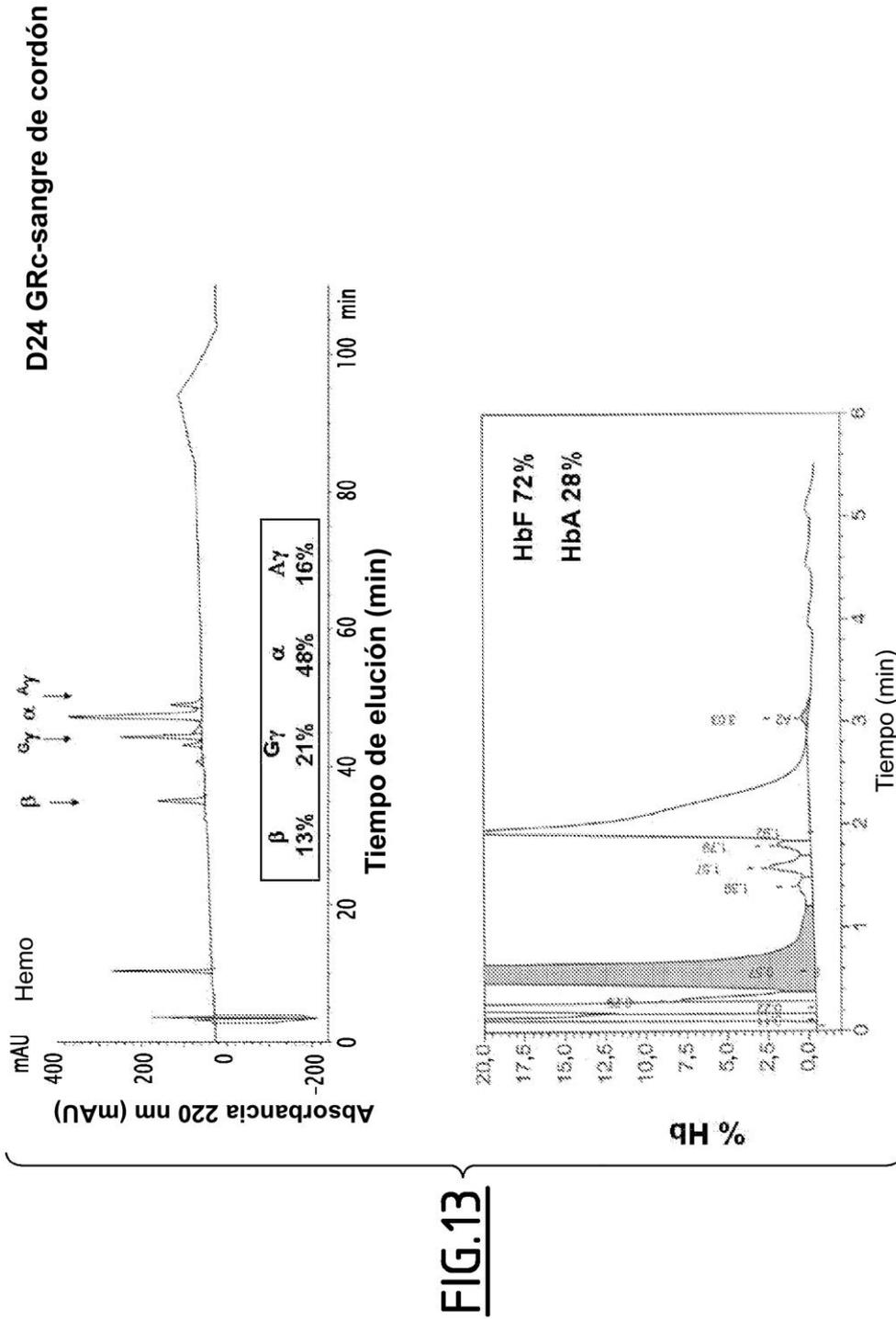


FIG.13

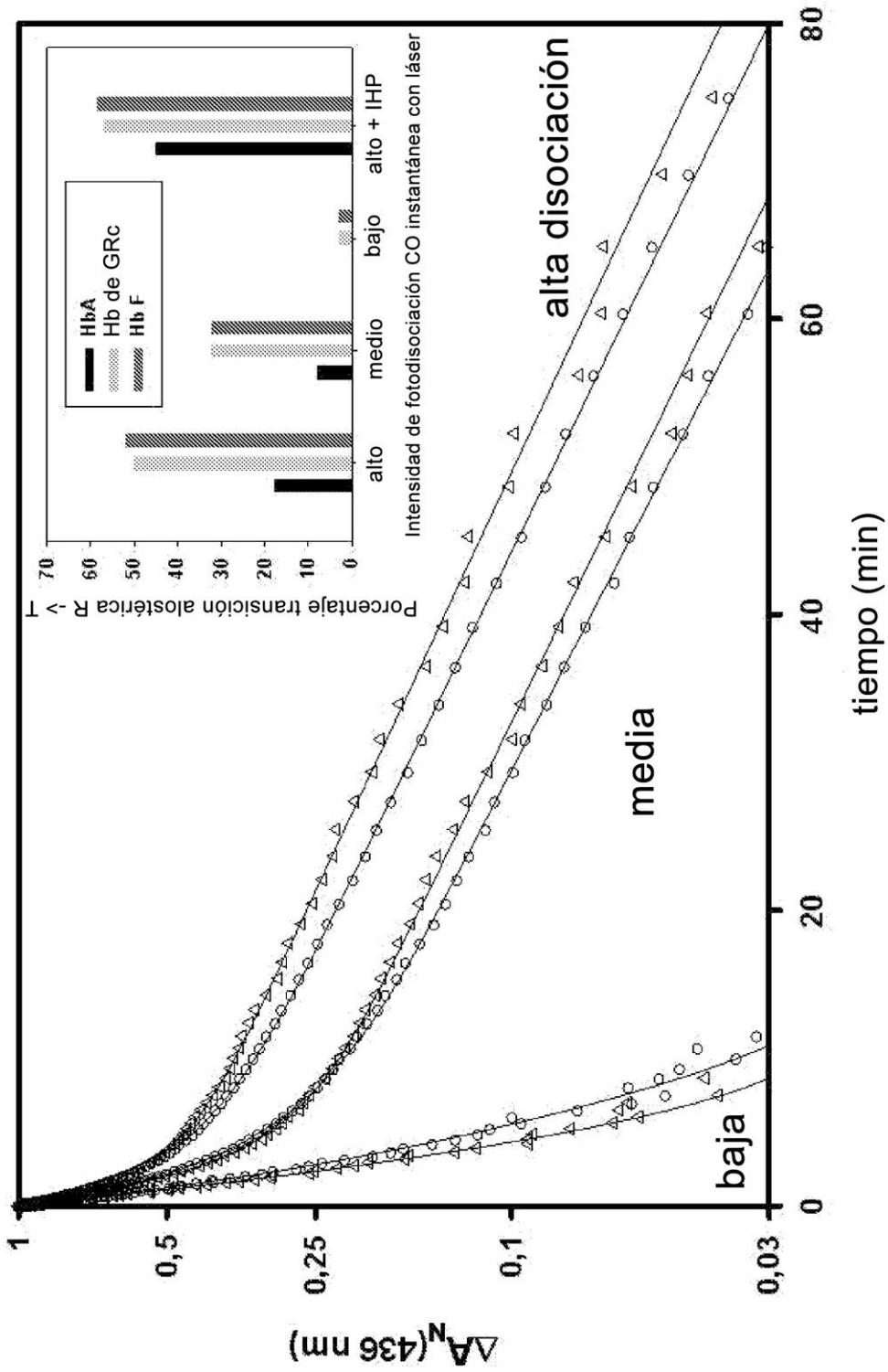


FIG.14