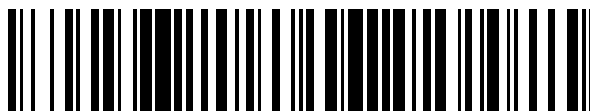


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 435**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2008 PCT/NL2008/050174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2008 WO08118020**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 08723925 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2142642**

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

30 Prioridad:

27.03.2007 EP 07105060

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

20.10.2017

73 Titular/es:

**IPD-THERAPEUTICS B.V. (100.0%)
Kloosterstraat 9, Kamer RE 1134
5349 AB Oss, NL**

72 Inventor/es:

**SPANHOLTZ, JAN y
DOLSTRA, HARRY**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 638 435 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

- 5 Métodos y medios para proliferación de células madre y posterior generación y expansión de células progenitoras, así como también producción de células efectoras como terapéuticos clínicos.
- La invención se refiere al campo de la biología molecular moderna. En particular la invención se refiere a la tecnología de células madre. Más en particular la invención se refiere a la tecnología de células madre, en particular tecnología de células madre postembrionarias.
- 10 Las células madre son células primordiales indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células. Esta capacidad les permite actuar como un sistema reparador del cuerpo, reponiendo otras células siempre y cuando el organismo esté vivo.
- Las células madre se categorizan por potencia que describe la especificidad de esa célula.
- 15 Las células madre totipotentes son células que tienen la capacidad de autorrenovación y son capaces de diferenciarse en todos y cada uno de los tipos de células para formar un organismo completamente nuevo. Se producen normalmente a partir de la fusión de un óvulo y células de esperma. Las células producidas por las primeras pocas divisiones de la célula de ovario fertilizada también son totipotentes. Estas células pueden crecer en cualquier tipo de célula sin excepción.
- 20 Las células madre pluripotentes son los descendientes de las células totipotentes y pueden crecer en cualquier tipo de célula a excepción para las células madre totipotentes.
- Las células madre multipotentes pueden solo pueden producir células de una familia de células estrechamente relacionada (por ejemplo, células madre hematopoyéticas que se pueden diferenciar en las células sanguíneas tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas).
- 25 Las células unipotentes (denominadas en ocasiones células progenitoras) solo pueden producir un tipo de célula tipo; pero, tienen la propiedad de autorrenovación que las distingue de las células no madre.
- 30 Las células madre también se caracterizan de acuerdo con su fuente, ya sean células madre embrionarias o adultos (postembrionarias).
- Las células madre de adultos son células indiferenciadas encontradas entre células diferenciadas de un tejido específico y principalmente son células multipotentes. Se denominan más precisamente células madre somáticas, porque no necesitan venir de adultos, sino que también pueden venir de niños o de cordones umbilicales.
- 35 Las células madre embrionarias son células obtenidas de células de masa interna indiferenciadas de un blastocito, un embrión en etapa primaria que tiene 50 a 150 células.
- 40 La sangre proveniente de la placenta y el cordón umbilical que quedan después de un nacimiento es una fuente de células madre de adulto. Se recolectan al retirar el cordón umbilical, limpiarlo y extraer la sangre de la vena umbilical. Otras fuentes son la médula ósea (BM) o sangre periférica G-CSF movilizada (mPB).
- 45 Los glóbulos rojos y las plaquetas se pueden retirar de la sangre del cordón, BM o mPB y el resto de células que contienen las células madre se pueden utilizar o almacenar (por ejemplo, en nitrógeno líquido).
- Las células madre por sí mismas son útiles en muchas aplicaciones de la denominada medicina regenerativa. Se han utilizado para tratar enfermedades cardíacas, reparación de médula espinal y muchas otras enfermedades en donde se necesitan reemplazar tejidos de todos los tipos.
- 50 Las células madre también se pueden utilizar para producir determinados tipos de células diferenciadas que son las células efectoras en determinadas enfermedades.
- 55 Sin embargo, desafortunadamente, las células madre están presentes en el cuerpo de un mamífero solamente en pequeñas cantidades. Frecuentemente se presentan en órganos o tejidos que no se pueden alcanzar fácilmente. Las células madre embrionarias tampoco se pueden obtener fácilmente y solamente en mínimas cantidades. Más aún, existen algunas preocupaciones éticas en el cultivo de embriones exclusivamente para el propósito de producir células madre. Por lo tanto, subsiste la necesidad de métodos para multiplicar las células madre disponibles y/o progenies específicas de linaje primitivo de las mismas, sin diferenciación en descendientes menos potentes. Las células totipotentes deben permanecer totipotentes después de expansión y no cambiar en células madre pluripotentes, las células madre pluripotentes deben permanecer pluripotentes, etcétera. En algunos casos el cambio en un descendiente menos potente puede ser aceptable (por lo menos en cierta medida) mientras que se retiene el potencial para autorrenovación y por lo menos multipotencia.
- 60
- 65

Aunque las células madre tienen la capacidad de auto renovación, expansión y/ o mantener las células madre en cultivo no es una tarea fácil. En su sentido más amplio la presente invención proporciona una tecnología para cultivo de células madre y/o expansión y/o diferenciación que comprenden una serie de elementos que son extremadamente adecuados sólo para ese propósito.

5 Se describe aquí un medio para el cultivar, expandir y/o diferenciar posteriormente células madre en específicamente células efectoras objetivo deseada, dicho medio comprende un medio de cultivo celular básico, 0-25% de suero humano, glucosaminoglucono (GAG) desulfurado 0,1-100 mg/l, preferiblemente heparina (=UFH) o un equivalente funcional del mismo. Preferiblemente dicho GAG/UHF está completamente desulfurado. Preferiblemente dicho GAG/UHF no es fraccionado. Se prefiere particularmente dicho GAG es de bajo peso molecular GAG (LMWH). Se prefiere particularmente 10 dicho GAG de bajo peso molecular que es una heparina de bajo peso molecular, derivada preferiblemente de heparina estándar mediante despolimerización de UFH. Las heparinas de bajo peso molecular (LMWH), consisten en cadenas cortas de polisacárido. Los LMWH se definen como heparina o sales de heparina que tienen un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2000-10000 dalton, preferiblemente entre 5000 y 8000 dalton y más preferiblemente 15 aproximadamente 8000 dalton, preferiblemente por lo menos 60% de las cadenas tienen menos que la longitud de cadena promedio. Cuando el promedio de bajo peso molecular de heparina es de aproximadamente 8000 dalton se prefiere que por lo menos el 60% de todas las cadenas tengan un peso molecular menor de 8000 da. Se pueden obtener LMWH mediante diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan diversos métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de heparina de bajo peso molecular. Una lista no limitante se 20 proporciona aquí adelante. Una heparina descrita aquí se puede obtener a partir de un mamífero u otro organismo tal como caracoles, alternativamente las heparinas se sintetizan sintéticamente o semisintéticamente. Un ejemplo de la última es la producción de heparina en bacterias tal como pero no limitado a la heparina K5 por E.coli. Modificaciones de heparina tal como pero no limitadas a acilación, desulfatación fosforilación también se considera que son una heparina como se define aquí. Ejemplos preferidos pero no limitantes de dichas modificaciones son LMWH completamente o parcialmente desulfatado, LMWH completamente o parcialmente desulfatado y completamente o parcialmente Re-N-acilado, LMWH completamente o parcialmente desulfatado y completamente o parcialmente Re-N-sulfatado, sustancia L4: LMWH completamente o parcialmente desulfatado y completamente o parcialmente Re-N-fosforilado, meno de 8000 Da y para el que por lo menos 60% de todas las cadenas tienen un peso molecular menor de 8000 Da. Éstas se pueden obtener mediante diversos métodos de fraccionamiento o despolimerización de heparina polimérica. Se utilizan diversos métodos de despolimerización de heparina en la fabricación de una heparina de bajo peso molecular. Adelante se proporciona una 30 lista no limitante.

Despolimerización oxidativa con peróxido de hidrógeno. Utilizada en la fabricación de ardeparina (Normiflo®)

35 División desaminativa con nitrito isoamilo. Utilizado en la fabricación de certoparina (Sandoparin®)

División beta-eliminadora alcalina de bencil éster de heparina. Utilizado en la fabricación de enoxaparina (Lovenox® y Clexane®)

40 Despolimerización oxidativa con Cu²⁺ y peróxido de hidrógeno. Utilizado en la fabricación de parnaparina (Fluxum®)

División beta-eliminadora por enzima heparinasa. Utilizado en la fabricación de tinzaparina (Innohep® y Logiparin®)

45 División desaminadora con ácido nitroso. Utilizada en la fabricación de dalteparina (Fragmin®), reviparina (Clivarin®) y nadroparina (Fraxiparin®)

50 Una combinación de citoquinas adecuadas, abarcan preferiblemente tres o más de trombopoyetina, flt-3 lig- y, factor de células madre, IL-3, IL-7, IL-15, IL-2 en cantidades de saturación (>4 ng/ml) así como una combinación de G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α y LIF en cantidades fisiológicas (<250 pg/ml) y complementos convencionales adicionales, tal como L-glutamina, antibióticos, ácido ascórbico, selenita de selenio, sal de litio, etanolamina y 2-beta-mercaptoetanol. Las citoquinas dadas se seleccionan por sus funciones. Para algunas de las citoquinas dadas existen otras citoquinas que por lo menos serán capaces en parte de realizar la misma función. Aquellas pueden luego por supuesto sustituir las enumeradas.

55 Preferiblemente un medio descrito aquí comprende aproximadamente 1-100, más preferiblemente aproximadamente 15-50 mg/l de GAG/UHF desulfatado o un equivalente funcional del mismo puede estar presente en diferentes cantidades que son equivalentes en actividad a las cantidades dadas para el UFH desulfatado. Preferiblemente 1-100mg, más preferiblemente 15-50mg de heparina de bajo peso molecular (LMWH) se utiliza, preferiblemente derivado de heparina estándar mediante despolimerización UFH. Un equivalente funcional puede estar presente en diferentes cantidades que 60 son equivalentes en actividad a las cantidades dadas para el LMWH.

Las cantidades de citoquinas agregadas son convencionales en la técnica, se proporcionan cantidades preferidas en los ejemplos, pero el 10% de las desviaciones en la cantidad son muy bien aceptables.

65 Se conocen muchos medios básicos. Adelante se proporciona una selección, pero muchos más pueden ser adecuados. Los medios básicos incluyen, pero no se limitan a BEM (Medio Eagle Básica), DMEM (Medio Eagle modificado de

Dulbecco), medio esencial mínimo de Glasgow, medio basal M199, HAM F-10, HAM F-12, DMEM de Iscove, RPMI, Leibovitz L15, MCDM, McCoy 5A, StemSpan H3000® y StemSpanSFEM®, Stemline I™ y Stemline II™; X-Vivo10™, X-Vivo15™ y X-Vivo20™, etc.

5 También se pueden utilizar combinaciones de estos medios básicos. Preferiblemente formulaciones libres de suero, tal como Stemline I™ y Stemline II™, StemSpan H3000®, StemSpan SFEM® o X-Vivo10™, X-Vivo15™ y X-Vivo20™ se utilizarán en el punto de tiempo de iniciación del cultivo con/o sin la adición de suero humano. Se prefieren las combinaciones de DMEM y HAM F-12 en puntos de tiempo específicos. Las cantidades dadas aquí son normalmente adecuadas para cultivos que se inician con preferiblemente aproximadamente 100,000 células por ml. Las cantidades se pueden adaptar para diferentes cantidades de células con las que se inician los cultivos.

10 La media se puede variar en su contenido de suero, preferiblemente junto con una combinación diferente de citoquinas para proporcionar un medio de expansión o un medio de diferenciación y o alternativamente un medio de diferenciación+expansión en puntos de tiempo definidos.

15 Se describe aquí un medio y un método para hacer proliferar células madre con la posterior generación células progenitoras específicas de linaje primitivos, particularmente células madre de sangre de cordón umbilical (UCB), médula ósea (BM) o sangre periférica G-CSF-movilizada (mPB) que se proporcionan en una forma en que la proliferación de células madre produce una célula madre hija y una célula madre progenitora primitiva, la última con la capacidad de autorrenovación extensa y maduración funcional. Normalmente desde 100.000 células de una población enriquecida con célula madre $> 2 \times 10^6$ progenitores primitivos se pueden generar mientras conserva el grupo de células madre. Cada progenitor primitivo es capaz de producir $> 1 \times 10^3$ células efectoras maduras funcionales. La población enriquecida con células madre pueden ser células CD34+ aisladas y/o células CD133+. Alternativamente, células mononucleares (MNC) que contienen todas las CD34+ así como todas las células CD133+ también son adecuadas.

20 La presente invención se dirige a un método para la expandir y diferenciar células progenitoras hematopoyéticas que comprenden cultivar células de una muestra que comprende células madre, células progenitoras o ambas, de tejidos postembrionarios humanos en un medio de expansión que comprende un medio de cultivo celular, 1-100 mg/l de heparina desulfatada (UFH) y/o heparina de bajo peso molecular (LMWH) que tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2000-10000 dalton, una colección de citoquinas en el que dicha colección de citoquinas comprende trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madre e IL-7 y opcionalmente comprende adicionalmente IL-3, en convencional (cantidades saturadas >4 ng/ml) y en adición a G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α y LIF en cantidades fisiológicas (<250 pg/ml) y suplementos convencionales adicionales, y cultivar las células adicionalmente en un medio de expansión y diferenciación que comprenden una recolección de citoquinas, 1-100 mg/l de heparina desulfatada (UFH) y/o heparina de bajo peso molecular (LMWH) que tiene un promedio de peso molecular de entre aproximadamente 2000-10000 dalton y suero humano, en el que dicha recolección de citoquinas comprende trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madre, IL-7, IL-2, IL-15 y adicionalmente G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , y LIF, en el que las células cultivadas se diferencian y expanden.

30 Preferiblemente, un medio de expansión de acuerdo con la invención comprende 15-50 mg/l de UFH de sulfatado o LMWH. El medio básico preferido es una formulación libre de suero disponible comercialmente, tal como el medio Stemline I™ y Stemline II™, StemSpan H3000® y/o StemSpan SFEM®.

35 Un medio preferido es un medio para expansión que comprende trombopoyetina, ligando flt-3, factor de células madre, IL-7, en cantidades convencionales, así como G-CSF, GM-CSF, IL-6, MIP-I- α , LIF, preferiblemente en las cantidades dadas en los ejemplos.

40 También se describe aquí una diferenciación y adicionalmente un medio de expansión+diferenciación para expansión/diferenciación simultánea de células madre en progenitores de células Citotóxicas Naturales y la posterior maduración en células NK maduras funcionales. El medio básico puede ser el medio comercialmente disponible tal como Stemline I™ y el medio Stemline II™, X-Vivo10™, X-Vivo15™, X-Vivo20™, StemSpan H3000®, StemSpan SFEM®, IMDM, DMEM, RPMI, HAM F-10, HAM F-12, etcétera se prefiere una mezcla de 2:1 (v/v) DMEM y HAM F-12. Se tiene que agregar suero AB humano en una concentración final entre 1-25% preferiblemente la cantidad de suero es de aproximadamente 5-15%.

45 Una combinación preferida de citoquinas para el medio de expansión+diferenciación es TPO, FLT - 3L, SCF, IL-7, IL-2, IL-15, en cantidades convencionales y en adición a GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP- α y IL-6 preferiblemente en las cantidades dadas en el ejemplo. Este medio se aplica preferiblemente después de la etapa de expansión inicial de células madre (5-15 días después de la iniciación).

50 En una realización particularmente preferida un método para expansión y diferenciación comprende por lo menos un cambio de condiciones entre un medio de expansión inicial y por lo menos un medio de expansión/diferenciación aplicada posteriormente como se ilustra en la figura 1:

55 Preferiblemente el cultivo se inicia en condiciones libres de suero complementados con sal de litio y 1-100 mg/l de UFH o LMWH desulfatado y/o modificado químicamente adicionalmente. En algunas etapas, (preferiblemente después de 5-15 días

de cultivo), preferiblemente entre el día 7-11, el medio se intercambia con el medio de expansión+diferenciación que preferiblemente contiene ahora suero humano (1-25%, preferiblemente 10-20%) e IL-2. En algunas etapas (preferiblemente entre el día 10 y 23, preferiblemente entre el día 13-20), el UFH/LMWH así como la sal de litio que se ha complementado de acuerdo con la invención se retira del medio. Esto se logra preferiblemente al reemplazar el medio de cultivo con medio fresco que no contiene dicho litio. Normalmente esto se logra al reemplazar el medio de cultivo con medio de expansión y diferenciación. Adicionalmente, en algunas etapas (preferiblemente entre el día 10-23, preferiblemente entre el día 11-15) la cantidad de 3 citoquinas fit3-L, SCF y TPO se reduce a cantidades <4 ng/ml.

Todos los medios son preferiblemente refrescados cada tercer día, preferiblemente 3 veces/semana. El refresco se logra preferiblemente al reemplazar por lo menos 30% del medio con medio fresco. Preferiblemente por lo menos 50% del medio se reemplaza, más preferiblemente por lo menos 100% del medio se reemplaza. El remplazo del medio se puede combinar con intercambio de medio para cambiar del medio de expansión a medio de expansión y diferenciación. Se prefiere ajustar la cantidad de medio de tal manera que las células al inicio del cultivo (continuado) tienen una densidad entre 100,000 a 1,000,000 de células por ml de medio. Preferiblemente una densidad de entre 100,000 y 500,000 células por ml de medio.

La invención abarca los métodos para mantener las células madre proliferantes con la generación y expansión de células progenitoras, en particular células madre para sangre de cordón umbilical, BM o mPB, que comprende cultivar células madre de sangre de cordón, cultivar dichas células en un medio de acuerdo con la invención y separar las células expandidas de dicho medio. La invención comprende adicionalmente métodos para diferenciar células madre en células progenitoras NK y adicionalmente en células NK maduras funcionales que comprenden cultivar dichas células madre, en particular células madre derivadas de sangre de cordón umbilical, BM o mPB, en medio de expansión + diferenciación descrito aquí y preferiblemente cultivar dichas células madre en un medio de expansión y posteriormente en un medio de expansión+diferenciación en un esquema como se proporciona en la descripción detallada adelante. El cultivo se hace preferiblemente bajo condiciones adecuadas convencionales normalmente que abarcan aproximadamente 37 grados Celsius, 100% RH, 10% O₂ y 5-7% CO₂.

La invención también abarca células madre proliferadas y mantenidas producidas mediante un proceso de acuerdo con la invención.

La invención también abarca células progenitoras citotóxicas naturales producidas mediante un método de acuerdo con la invención.

En una realización adicional la invención comprende un grupo de medios (equipo de partes) para proliferación y mantenimiento de células madre, en particular derivadas de sangre de médula, BM, o mPB y generación de células progenitoras NK primitivas con la posterior expansión y maduración funcional en células NK maduras, que comprenden un medio de expansión descrito aquí, un medio de expansión+diferenciación descrito aquí y preferiblemente un panfleto de instrucciones para uso del medio.

Las células progenitoras NK se pueden diferenciar en células NK maduras y funcionales que reconocen un objetivo deseado mediante receptores específicos sobre su superficie conocidos por el experto en el campo (CD56, CD16, CD107a, NKG2A/CD94, NKG2D, receptores NCR, receptores KIR, etcétera.). Estas células NK maduras y funcionales se pueden generar in vitro de acuerdo con la invención. Las células progenitoras NK generadas se pueden inyectar en pacientes como terapéuticos celulares seguidos por maduración y expansión in vivo dentro del cuerpo del paciente. Alternativamente, las células NK activas maduras y funcionales se pueden generadas in vitro de acuerdo con la invención e inyectarse como células NK funcionalmente activas y maduras. Ambas aplicaciones mencionadas anteriormente (infusión NK-IC-progenitor así como la infusión de células NK maduras in vitro) se puede utilizar para el tratamiento de cualquier tipo de enfermedad humana preferiblemente todas las enfermedades malignas tal como tumores, cáncer, leucemia, así como todas las enfermedades víricas, también en situaciones de rechazo de trasplantes sólido y enfermedades autoinmunitarias y pérdida de embarazo.

En una realización adicional las células NK generadas in vitro así como las células NK maduras y expandidas demuestran actividad citotóxica funcional contra objetivos utilizados y aceptados comúnmente, tal como tumores malignos. Adicionalmente, la actividad productora de citoquinas de células NK normales está probada dentro de las células NK maduras generadas

Métodos para (expandir y) diferenciar células madre en células progenitoras NK y hacia adelante en células NK también hacen parte de la presente invención.

Las células NK específicas objetivo producidas mediante estos métodos también hacen parte de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las células progenitoras o células NK maduras producidas de acuerdo con la invención que comprenden adicionalmente constituyentes habituales de dichas composiciones también hacen parte de la presente invención. Las dosis para dichas composiciones farmacéuticas se expresan en general en el número de células viables presentes en dicha composición. Dicho número debe estar entre 1-10 x 10⁶ NK-IC o 1-10 x 10⁷ células NK maduras por kg de peso corporal de un sujeto que se va a tratar.

Descripción detallada

La siguiente descripción divulga un método de generación in vitro de terapéuticos celulares para uso clínico que se pueden derivar de pequeñas alícuotas de células madre postembrionarias. Este procedimiento se caracteriza al cultivar células madre postembrionarias en un medio formulado específicamente con una composición definida así como un cultivo definido que maneja el procedimiento para producir suficientes progenitores para aplicación clínica.

La invención divulgada aquí se basa por lo menos en parte en el problema técnico de que para el tratamiento de enfermedades malignas, es decir cáncer, leucemia y linfoma así como para situaciones de rechazo de trasplante y enfermedades autoinmunitarias y pérdida del embarazo. La disponibilidad de las terapias celulares es muy limitada. Con la excepción de muy pocos trasplantes de células madre hematopoyéticas que utilizan sangre de cordón umbilical (UCB), no se han utilizado células madre postembrionarias para tratamiento celular dirigido en un escenario de trasplante no halogénico sin acondicionamiento de altas dosis de quimioterapia/radiación del paciente principalmente debido al hecho de que, aún no están disponibles suficientes células progenitoras dirigidas para terapia celular. Adicionalmente, estas células son aloreactivas y provocan graves enfermedades injerto versus anfitrión en el receptor si no se selecciona un producto celular óptimo.

El problema técnico se resuelve por lo menos parcialmente en esta invención al proporcionar procedimientos practicables para generar suficientes números de progenitores así como células efectoras maduras para tratamientos seleccionados como se indica aquí adelante. El problema técnico de la generación progenitora seleccionada de células madre postembrionarias humanas para aplicación clínica se puede resolver al aplicar ambos procedimientos bien definidos de las etapas de cultivo in vitro, así como los cambios específicos de las condiciones de cultivo como se describe en la sección de método. Estos procedimientos permiten por primera vez la producción de progenitores de células Citotóxicas Naturales (células NK) adecuadas en número y función para aplicaciones clínicas de pequeñas alícuotas de células madre postembrionarias.

Las siguientes células madre postembrionarias que se pueden obtener empiezan desde la semana 12 después de gestación de hígado fetal, sangre de cordón umbilical perinatal (UCB), médula ósea humana (BM) o sangre periférica G-CSF estimulada (mPB) se puede aislar y utilizar para procedimientos de cultivo de acuerdo con la invención. El experto en la técnica conoce los métodos para la recolección de estas células madre, con lo cual la cosecha del cordón umbilical perinatal, BM, o mPB se prefiere para los procedimientos de acuerdo con la invención.

En una realización preferida adicional de los procedimientos de acuerdo con la invención se realiza una prueba funcional de los terapéuticos celulares finales consecutivos para cultivo. Se prefiere especialmente la prueba de características progenitoras de células Citotóxicas Naturales (células NK) así como la función de prueba para células NK maduras, activas.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

1. Iniciación del cultivo in vitro y expansión de las células madre postembrionarias:

Pequeñas alícuotas de células madre postembrionarias (mínimo 10-20 ml de sangre de cordón umbilical humano, una cantidad que está bien por debajo de la cantidad mínima requerida para bancos clínicos) se procesan de acuerdo con procedimientos de funcionamiento estándar de lisis de glóbulos rojos para obtener células nucleadas para procesamiento adicional. Como una opción las células se pueden purificar adicionalmente mediante separación celular inmunomagnética de acuerdo con el fabricante (Miltenyi-Biotec, Alemania) en células CD34+ enriquecidas (o alternativamente células CD133+) y adicionalmente también se pueden separar células CD14+. El experto en este campo será capaz de realizar estas separaciones de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Estas células se ponen en frascos de cultivo o bolsas de teflón que contienen un medio de expansión de acuerdo con la invención descrita que en este caso serán las denominadas

Medio 1 de expansión de Glicostema (GEM1):

Se utiliza el medio de expansión o GEM1 en la invención en este ejemplo que consiste de X-vivo10™ (Cambrex Inc.) que contiene 5% de AB-suero humano (Cambrex Inc.), heparina de bajo peso molecular (LMWH), que se deriva de una heparina de mucosa de porcino mediante división con ácido nítrico, en una concentración de 50 mg/l. Las siguientes citoquinas humanas recombinantes (si no se mencionan específicamente todas las citoquinas que se han proporcionado por Stem Cell Technology Inc. o R&D Systems): trombopoyetina (TPO; 35 ng/ml); ligando FLT-3L (FLT - 3L; 35 ng/ml), factor de células madre (SCF; 35ng/ml), interleuquina- 7 (IL-7; 35 ng/ml), factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF; 10 pg/ml), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína alfa 1de inflamación- macrófago (200 pg/ml; MIP-I alfa) e interleuquina 6 (IL-6; 50 pg/ml). Complementos adicionales son la L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomina 100 U/ml (Invitrogen), 25 µm de ácido 2-beta-mercaptoetanol (Invitrogen) ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenita de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (Sigma 50 µmol); cloruro de litio (100 µmol Fluka).

El cultivo de iniciación se puede realizar en 3 formas alternas:

- a) inoculación de células nucleadas después de lisis de glóbulos rojos en medio GEM1
- 5 b) inoculación de células CD34+ separadas (para células CD133+ alternativamente) en medio GEM1
- c) inoculación de células CD34+ separadas (o alternativamente células CD133+) junto con células CD14+ separadas como se complementa en medio GEM1 en una relación de 1 célula de CD34+ [o alternativamente células CD133+]: 1célua CD14+)
- 10 La relación final de medio a las células inoculadas fue de 1×10^6 células totales de por 1 ml de medio o 1×10^5 CD34+ (o alternativamente células CD133+). Las condiciones de cultivo se refrescarán al utilizar medio nuevo cada 2 días. Se preferirá el siguiente procedimiento:
- 15 Día 0: 1×10^5 células positivas CD34 se siembran en 1 ml del medio
- Día 2: adición de 1 ml de medio GEM-1 por 1×10^5 células de entrada totales
- Día 4: adición de 1 ml de medio GEM-1 por 1×10^5 células de entrada totales
- 20 Día 6: adición de 1 ml de medio GEM-1 por 1×10^5 células de entrada
- Día 8: adición de 1 ml de medio GEM-1 por 1×10^5 células de entrada totales
- 25 Las células se cultivan en el medio de expansión mencionado anteriormente de acuerdo con la invención descrita con relaciones bajo condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas de ejemplo con respecto a los recipientes de cultivo adecuados, temperatura, humedad relativa, contenido de O_2 y CO_2 del gas de fases son conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente bajo las siguientes condiciones: (a) $37^\circ C$, (b) humedad relativa del 100% (c) 10% O_2 y (d) 5% de CO_2 .
- 30 2. Iniciación de diferenciación y generación de células madres postembrionarias expandidas en un producto de células Citóxicas Naturales in vitro:
- En el día 7-11 de cultivo se realiza el primer cambio de condiciones de cultivo basal con respecto al medio de suplementación. En este punto se activa el cultivo de suspensión celular en diferenciación de células NK.
- 35 El producto completo se diferencia adicionalmente en progenitores NK y adicionalmente se madura en células NK durante el período de cultivo.
- 40 Las cantidades designadas del producto de cultivo celular inicial se complementan con un medio de expansión y diferenciación utilizado en esta invención. En este ejemplo se agregará en el día 9 después de iniciación de cultivo un medio de expansión y diferenciación utilizado en esta invención, el denominado medio 1 de expansión y diferenciación de células NK de Glicostem (NGKED1):
- 45 El medio consiste de medio F12 DMEM/Ham (Invitrogen Inc.) relación de volumen 2:1 (V/V) que contiene suero AB-humano al 20% (Cambrex Inc.), heparina de bajo peso molecular (LMWH) hasta el día 16-18, que se deriva de heparina de mucosa de porcino mediante división con ácido nitroso, en una concentración de 50 mg/l. Las siguientes citoquinas humanas recombinantes (si no se mencionan específicamente todas las citoquinas que se han probado por Stem Cell Technology Inc. o R&D Systems): trombopoyetina (TPO 1ng/ml); Ligando FLT-3L (FLT-3L; 1 ng/ml), factor de células madre (SCF, 1 ng/ml), interleuquina 7 (IL-7; 25 ng/ml), interleuquina-15 (IL-15, 25 ng/ml), interleuquina-2 (Proleukin© [Chirón]; 1000 U/ml), factor estimulador de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF, 10 pg/ml), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína alfa 1 inflamatoria de macrófagos(200 pg/ml; MIP-I alfa) e interleuquina 6 (IL-6; 50 pg/ml). Complementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomycin 100 U/ml (Invitrogen), 25 μm de 2-beta-mercaptoetanol (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenita de selenio (50 μmol , Sigma), etanolamina (Sigma 50 μmol).
- 55 Las condiciones de cultivo se refrescarán dos días a la semana al agregar nuevo medio. Se preferirá el siguiente procedimiento:
- 60 Día 9: adición de 5 ml de medio GNKED1 por 1×10^5 células de entrada total
- Día 13: adición de 5 ml de medio GNKED1 por 1×10^5 células de entrada total
- Día 16: adición de 5 ml de medio GNKED1 por 1×10^5 células de entrada total
- 65 Día 20: adición de 5 ml de medio GNKED1 sin heparina por 1×10^5 células de entrada total

Día 23: adición de 5 ml de medio GNKED1 sin heparina por 1×10^5 células de entrada total

Día 27: adición de 5 ml de medio GNKED1 sin heparina por 1×10^5 células de entrada total

5 Día 30: adición de 5 ml de medio GNKED1 sin heparina por 1×10^5 células de entrada total

10 Las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente utilizado en esta invención y las relaciones bajo condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas de ejemplo con respecto a los recipientes de cultivo adecuados, temperatura, humedad relativa, contenido de O_2 y CO_2 de la fase de gas son conocidos por el experto. Preferiblemente las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente bajo las siguientes condiciones: (a) $37^\circ C$, (b) humedad relativa del 100% (c) 10% de O_2 y (d) 5% de CO_2 .

15 Se pueden cosechar progenitores de célula NK inmaduras (NK-IC) de cultivos entre el día 15-20 después de iniciación seguido por 2 etapas de lavado en PBS que contiene AB-de suero humano al 1% que se realizan de acuerdo con procedimientos de operación estándar conocidos por el experto en el campo. Después de eso las células se suspenden en solución de NaCl fisiológica (0,9%) para infusión en el paciente. Después de infusión, las células NK maduras específicamente dentro del cuerpo del paciente (in vivo) y diferenciadas finalmente in vivo en células citotóxicas naturales completamente funcionales que son capaces de matar células de tumor específicas a objetivos.

20 Alternativamente, las células se expandirán y diferenciarán hasta que el día 26-30 obtengan células NK funcionalmente maduras que se han expandido/diferenciado $>2 \times 10^4$ desde los números de entrada. Todas las células se cosechan y se realizan 2 etapas de lavado en PBS que contiene 1% de AB de suero humano de acuerdo con procedimientos de funcionamiento estándar conocidos por el experto en el campo. Como una realización de la invención, las células NK maduras se activarán durante la noche antes de aplicación intravenosa al paciente mediante cultivo en medio X-vivo15, complementada con AB de suero humano al 10% y IL-2 (1000 U/ml), IL-15 (25 ng/ml) y IL-18 (25 ng/ml). Al siguiente día las células se lavan dos veces y resuspenden en solución fisiológica de NaCl (0,9%) para infusión en el paciente.

25 Las células citotóxicas naturales así generadas y activadas son capaces de matar las células tumorales específicas objetivo. Por esta razón al paciente se trata preferiblemente después de la infusión con IL-2 subcutáneo (Proleukin[®]) en una dosis de hasta 2×10^6 IU/kg de peso corporal.

30 Se utiliza una pequeña cantidad de células para el aseguramiento del control de producto y se analizará fenotípicamente para células NK maduras y funcionales en análisis de citometría de flujo.

35 Resultados del ejemplo 1 experimental:

40 En 3 experimentos independientes (muestras UCB, cantidad entre 10-25 ml) se enriquecen células CD34+ y se expanden 1×10^3 células en medio GEM1 de acuerdo con la invención durante 9 días seguido por una expansión de 18 días y la diferenciación en medio GNKED1. La cantidad total de células CD56⁺/CD3⁻ generados en estos experimentos fue de $2,05 \pm 0,35 \times 10^7$ células con una cantidad de $90,5 \pm 4,2\%$ de células vivas y una pureza de $92,0 \pm 5,1\%$ de células NK totales (figura 2). En el experimento de control sin las etapas de la invención se generan $0,67 \pm 0,33 \times 10^6$ células NK con medio de supervivencia de $46 \pm 4,1\%$ y una pureza de $34,1 \pm 6,6\%$ (figura 3).

45 Figura 2: la gráfica muestra un análisis de una muestra pequeña de células NK generadas de acuerdo con la invención descrita. Esta gráfica se traza con respecto a células vivas CD3⁻ y muestra la correlación de los antígenos CD56 y CD34.

Las células generadas en este ejemplo contienen más del 92% de células NK CD56⁺/CD3⁻.

50 Figura 3: la gráfica se muestra un análisis de una muestra pequeña de células NK generadas sin etapas de la invención. Esta gráfica se traza con respecto a células vivas CD3⁻ y muestra la correlación de antígenos CD56 y CD34.

Ejemplo experimental 2:

55 En una segunda configuración de experimentos se procesan alícuotas de células madre postembrionarias (mínimo 10-20 ml de sangre de cordón umbilical humano o BM) de acuerdo con procedimientos de operación estándar de lisis de glóbulos rojos para obtener células nucleadas para su procesamiento adicional. Como una opción las células se pueden purificar adicionalmente mediante separación inmunomagnética de células de acuerdo con el fabricante (MiltenyiBiotec, Alemania) en células CD34+ enriquecidas (o alternativamente células CD133+) y adicionalmente se pueden separar también células CD14+. El experto en este campo será capaz de realizar estas separaciones de acuerdo con los procedimientos del fabricante. Estas células se ponen en unos frascos de cultivo o bolsas de teflón que contiene un medio de expansión utilizado en la invención descrita en este caso será el denominado medio 2 de expansión de Glicostem (GEM2):

60 El medio utilizado en la invención descrita en este ejemplo consiste de StemSpan H3000[®] (Stem Cell Technology Inc.) que no contiene suero, pero está completamente desulfatado de heparina (Seikagaku), de 20 mg/l. Las siguientes citoquinas humanas recombinantes (si no se mencionan específicamente todas las citoquinas que se han proporcionado por Stem Cell Technology Inc. o R&D Systems): interleuquina 3 (IL-3, 5 ng/ml) trombopoyetina (TPO; 25 ng/ml); ligando

5 FLT-3 (FLT-3L; 25 ng/ml), factor de células madre (SCF; 25ng/ml), interleuquina-7 (IL-7; 25 ng/ml), factor estimulador de colonias de macrófago de granulocitos (GM-CSF, 10 pg/ml), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, 250 pg/ml), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína alfa 1 inflamatoria de macrófagos (200 pg/ml; MIP-I alfa) e interleuquina 6 (IL-6; 50 pg/ml). Complementos adicionales son la L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomina 100 U/ml (Invitrogen), 25µm de ácido 2-beta-mercaptoetanol (Invitrogen) ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenita de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (Sigma 50 µmol).

Se puede realizar el inicio del cultivo en tres formas alternativas:

10 d) inoculación de células nucleadas después de lisis de células rojas en medio GEM2

e) inoculación de células CD34+ separadas (o alternativamente células CD133+) en medio GEM2

15 f) inoculación de células CD34+ separadas (o alternativamente células CD133+) junto con células CD14+ separadas como complemento en medio GEM2 a una relación de 1 célula CD34+ [o alternativamente células CD133+]: 1 célula CD14+)

20 La relación final del medio con las células inoculadas es 1×10^6 células totales por 1 ml de medio o 1×10^5 CD34+ (o alternativamente células CD133+). Las condiciones del cultivo se refrescarán al agregar nuevo medio cada 2^{do} día. Se preferirá el siguiente procedimiento:

Día 0: 1×10^5 células positivas a CD34 se siembran en 1 ml de medio

Día 2: adición de 1 ml de medio GEM2 por 1×10^5 células de entrada totales

25 Día 4: adición de 1 ml de medio GEM2 por 1×10^5 células de entrada totales

Día 6: adición de 1 ml de medio GEM2 por 1×10^5 células de entrada totales

30 Día 8: adición de 1 ml de medio GEM2 por 1×10^5 células de entrada totales

Las células se cultivan en el medio anteriormente mencionado de acuerdo con la invención descrita y las relaciones bajo condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas de ejemplo con respecto a los contenedores de cultivo adecuados, temperatura, humedad relativa, contenido de O₂ y CO₂ de la fase de gas son conocidos por el experto.

35 Preferencialmente las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente bajo las siguientes condiciones: (a) 37°C, (b) 100% humedad relativa, (c) 10% de O₂ y (d) 5% de CO₂.

2. Iniciación de diferenciación y generación de las células madre postembrionarias expandidas en un producto de célula citotóxica natural in vitro:

40 En los días 7-11 del cultivo se realiza el primer cambio en las condiciones de cultivo basales con respecto al medio de complementación. En este punto el cultivo de suspensión celular se dirige a diferenciación de célula NK.

45 Todo el producto se diferencia adicionalmente en progenitores NK y se madura adicionalmente en células NK durante el período de cultivo.

50 Las cantidades designadas del producto de cultivo de célula inicial se complementan con un medio de expansión+diferenciación utilizado en la invención descrita. En este ejemplo en el día 9 después del inicio del cultivo se agregará un medio utilizado en la invención descrita que se denomina medio de expansión y diferenciación 2 de célula NK de Glycostem (GNKED2):

55 El medio utilizado en la invención descrita consiste de medio DMEM/Ham's F12 (Invitrogen Inc.) relación de volumen 2:1 (V/V) que contiene 10% de suero AB humano (Cambrex Inc.), heparina completamente desulfatada (Seikagaku), de 20 mg/l hasta el día 16-18. las siguientes citoquinas humanas recombinantes (si no se menciona específicamente todas las citoquinas se han proporcionado por Stem Cell Technology Inc. or R&D Systems): trombopoyetina (TPO; 1 ng/ml); ligando fit-3 (FLT-3L; 1 ng/ml), factor de célula madre (SCF; 1 ng/ml), interleuquina-7 (IL-7; 25 ng/ml), interleuquina-15 (IL-15; 25 ng/ml), interleuquina-2 (Proleukin® [Chiron]; 1000 U/ml), factor de estimulación de colonia de macrófago de granulocito (GM-CSF; 10 pg/ml), factor de estimulación de colonia de granulocito (G-CSF, 250 pg/ml), factor inhibidor de leucemia (LIF; 50 pg/ml), proteína inflamatoria de macrófago 1 alfa (200 pg/ml; MIP-I alfa) y interleuquina-6 (IL-6; 50 pg/ml). Los complementos adicionales son L-glutamina (2 mmol/l; Invitrogen), penicilina (1000 U/ml), estreptomina 100 U/ml (Invitrogen), 2-beta-mercaptoetanol 25 µM (Invitrogen) ácido ascórbico (20 mg/ml, Sigma), selenita de selenio (50 µmol, Sigma), etanolamina (50 µmol Sigma).

65 Las condiciones del cultivo se refrescarán dos días a la semana al agregar nuevo medio. Se preferirá el siguiente procedimiento:

Día 9: adición de 5 ml de medio GNKED2 por 1×10^5 células de entrada totales

Día 13: adición de 5 ml de medio GNKED2 por 1×10^5 células de entrada totales

5 Día 16: adición de 5 ml de medio GNKED2 por 1×10^5 células de entrada totales

Día 20: adición de 5 ml de medio GNKED2 sin heparina por 1×10^5 células de entrada totales

10 Día 23: adición de 5 ml de medio GNKED2 sin heparina por 1×10^5 células de entrada totales

Día 27: adición de 5 ml de medio GNKED2 sin heparina por 1×10^5 células de entrada totales

Día 30: adición de 5 ml de medio GNKED2 sin heparina por 1×10^5 células de entrada totales

15 Las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente de acuerdo con la invención descrita y las relaciones bajo condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas de ejemplo con respecto a contenedores de cultivo, temperatura, humedad relativa, contenido de O_2 y CO_2 de la fase de gas se conocen por el experto. Preferencialmente las células se cultivan en el medio mencionado anteriormente bajo las siguientes condiciones: (a) $37^\circ C$, (b) 100% humedad relativa, (c) 10% de O_2 y (d) 5% de CO_2 .

20 Los progenitores de células NK inmaduros (NK-IC) se pueden cosechar a partir de los cultivos entre el día 15-20 después de la iniciación seguido por 2 etapas de lavado en PBS que contiene suero AB humano al 1% que se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos operativos estándar conocidos por el experto en el campo. Posteriormente las células se resuspenden en solución fisiológica de NaCl (0.9%) para infusión en el paciente. Después de infusión, las células NK se maduran específicamente dentro del cuerpo de los pacientes (in vivo) y finalmente se diferencian in vivo en células citotóxicas naturales completamente funcionales que son capaces de eliminar objetivos específicos de células tumorales.

25 Alternativamente, las células se expandirán y se diferenciarán hasta el día 26-30 para obtener células NK funcionalmente maduras que se han expandido/diferenciado $>2 \times 10^4$ veces a partir de los números de entrada. Se cosechan todas las células y se realizan 2 etapas de lavado en PBS que contiene suero AB humano al 1% de acuerdo con los procedimientos operativos estándar conocidos por el experto en el campo. Como una realización de la invención, las células NK maduras se activarán durante la noche antes de aplicación intravenosa al paciente mediante cultivo en medio 15 x-vivo, complementado con suero AB humano al 10% e IL-2 (1000 U/ml), IL-15 (25 ng/ml) e IL-18 (25 ng/ml). Al día siguiente las células se lavarán dos veces y se resuspenderán en solución fisiológica de NaCl (0.9%) para infusión en el paciente.

30 Las células citotóxicas naturales generadas y activadas de esta manera son capaces de destruir objetivos específicos de células tumorales. Por esta razón, el paciente se trata preferiblemente inmediatamente después de infusión con IL-2 subcutánea (Proleukin®) a una dosis de 2×10^6 UI/kg de peso corporal.

35 Una pequeña alícuota de las células se utiliza para el control de la garantía de calidad del producto y se analizará fenotípicamente para células NK maduras y funcionales en análisis de citometría de flujo.

Resultados del ejemplo experimental 2

40 En 3 muestras UCB independientes (cantidad entre 10-25 ml) se enriquecieron células CD34+ y se expandieron 1×10^3 células en medio GEM2 de acuerdo con la invención descrita durante 9 días, seguido de una expansión y diferenciación de 18 días en medio GNKD2. La cantidad total de células CD56+/CD3- en estos experimentos fue de $2.13 \pm 0.55 \times 10^7$ células con una cantidad de $86.2 \pm 5.6\%$ de células vivas y una pureza de $83.8 \pm 4.8\%$ de células NK totales (Figura 4). En los experimentos de control sin etapas inventivas cruciales se generaron $0.97 \pm 0.13 \times 10^6$ células NK con una supervivencia media de $55.3 \pm 7.2\%$ y una pureza de $44 \pm 5.6\%$ (Figura 5).

45 Figura 4: La gráfica muestra un análisis de una pequeña muestra de células NK generadas de acuerdo con la invención descrita. Esta gráfica se realiza sobre células vivas CD3 y muestra la correlación de antígenos CD56 y CD34.

50 El medio utilizado en este periodo de cultivo de acuerdo con la invención descrita contiene heparina como se mencionó anteriormente. Las células CD56+/CD3- de células NK generadas en este ejemplo contienen más de 84% de células NK. Figura 5: La gráfica muestra un análisis de una pequeña muestra de células NK generadas de acuerdo con la invención descrita. Esta gráfica se realiza sobre células CD3- vivas y muestra la correlación de los antígenos CD56 y CD34

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para expandir y diferenciar células progenitoras hematopoyéticas que comprenden cultivar células de una muestra que comprende células madre, células progenitoras o ambos, desde tejido postembrionario humano en un medio expansión que comprende un medio de cultivo de célula, 1-100 mg/l heparina desulfurada (UFH) y/o heparina de bajo peso molecular (LMWH) que tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2000-10000 dalton, una colección de citoquinas en las que dicha colección de citoquinas comprende TPO, FLT-3L, SCF y IL-7, y opcionalmente comprende adicionalmente IL-3, en cantidades convencionales y adicionalmente a GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1 α y IL-6, en cantidades fisiológicas, y adicionalmente complementos convencionales, y cultivar las células adicionales en un medio de expansión y diferenciación que comprende una colección de citoquinas, 1-100 mg/l heparina desulfurada (UFH) y/o heparina de bajo peso molecular (LMWH) que tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2000-10000 dalton y suero humano, en el que dicha colección de citoquinas comprende TPO, FLT-3L, SCF, IL-7, IL-2, IL-15, y adicionalmente GM-CSF, G-CSF, LIF, MIP-1 α y IL-6, en el que las células cultivadas se expanden y diferencian.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio expansión comprende adicionalmente litio.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se logra el cambio para medio de expansión y diferenciación mediante reemplazo en forma de etapas y/o dilución de medio cultivo con medio de expansión y diferenciación.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de FLT-3, TPO y/o SCF se reduce durante cultivo.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el litio y/o UFH se reduce durante el cultivo.
- 25 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente recolectar células de cultivo.
- 30 7. Una colección de células ex vivo que se puede obtener mediante un método de acuerdo con reivindicaciones 1 a 6 y que comprende 10⁹ células citotóxicas naturales a partir de un único donante.
8. Una colección de células ex vivo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprenden células madre proliferadas o mantenidas o ambas.
- 35 9. Una colección de células ex vivo de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende células citotóxicas naturales progenitoras.
10. Una colección de células ex vivo de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dichas células son esencial y genéticamente idénticas.
- 40 11. Una colección de células ex vivo de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dichas células son funcionales inmunológicas.
- 45 12. Uso de una colección de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, para la preparación de un medicamento.
13. Uso de una colección de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que sufre de un tumor, una infección vírica o ambos.
- 50 14. Uso de una colección de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que sufre de una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o pérdida de embarazo.
- 55 15. Un kit de partes para generar células citotóxicas naturales a partir de células progenitoras, células madre o ambas dicho kit que comprende el medio de expansión y diferenciación de acuerdo con la reivindicación 1, y/o los componentes de los mismos en cantidades suficientes para producir dicho medio.
- 60 16. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende adicionalmente un medio de expansión de acuerdo con la reivindicación 1, y/o los componentes de los mismos en cantidades suficientes para producir dicho medio.
17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de la muestra son células madre somáticas de tejido postembrionario humano.
- 65 18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en el que después de 5 a 15 días de cultivar las células en el medio de expansión, el medio de expansión se reemplaza por el medio de expansión y diferenciación.

19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las células se diferencian en células NK.

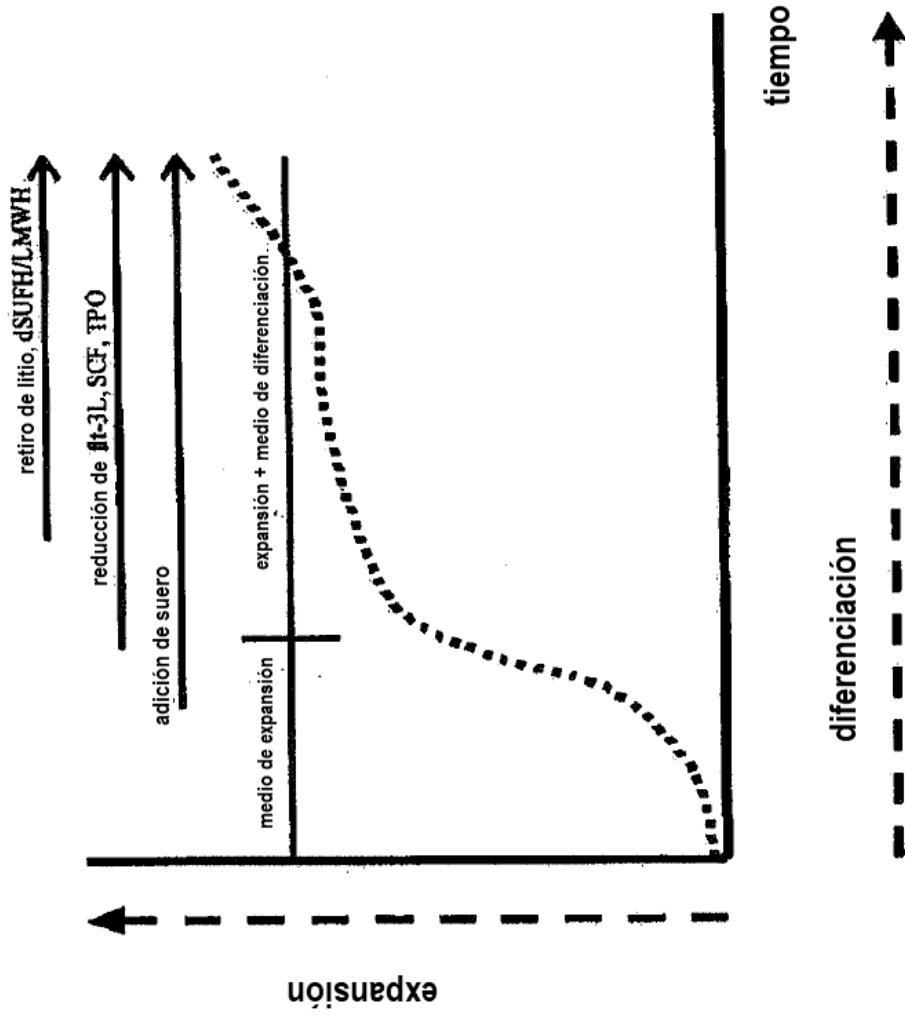


Figura 1

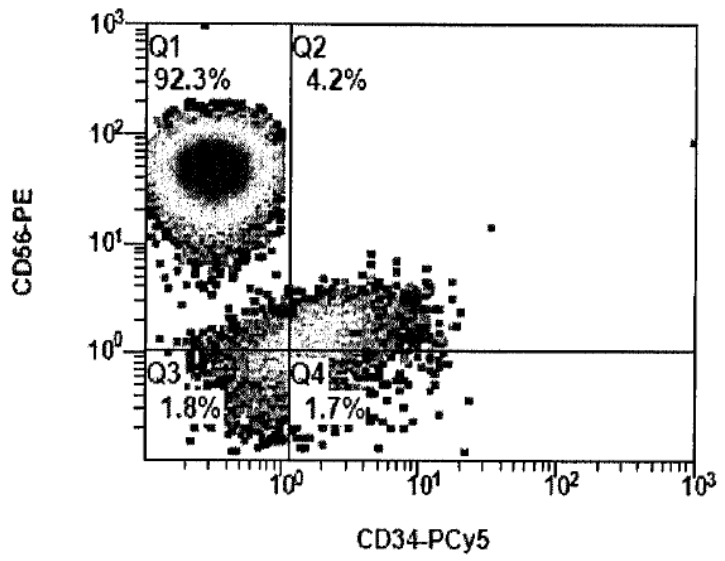


Figura 2

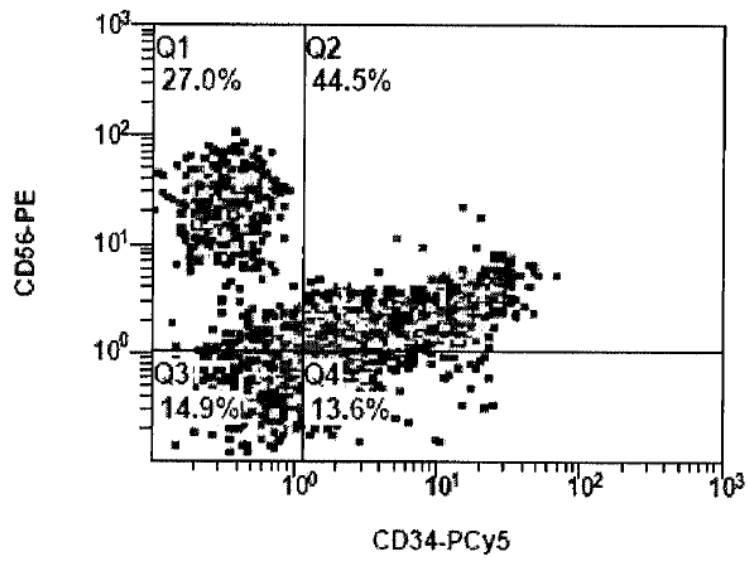


Figura 3

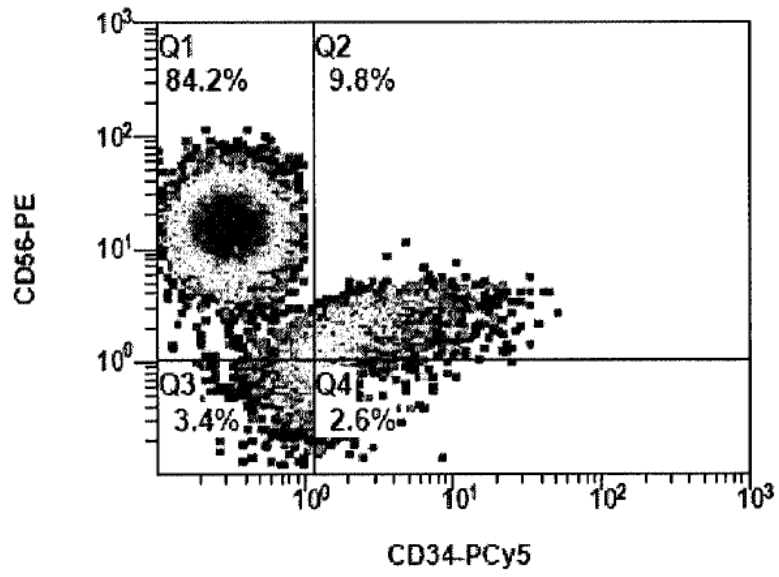


Figura 4

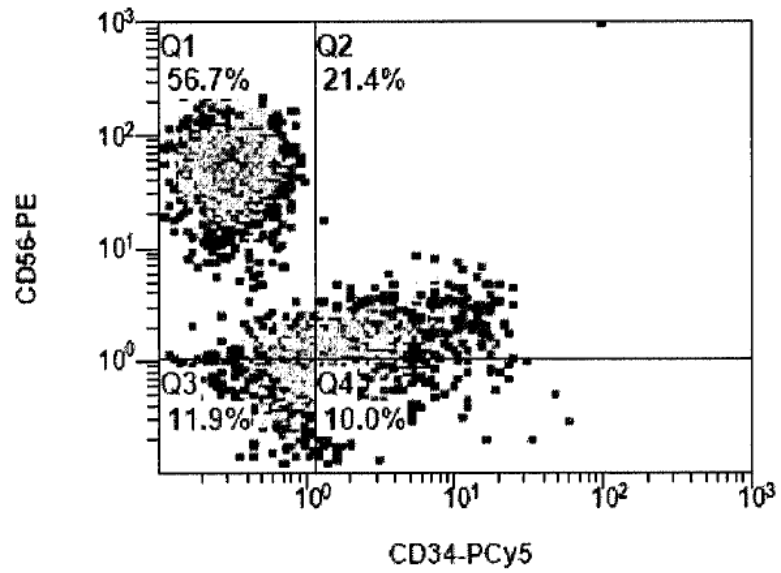


Figura 5