

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 840**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010 PCT/EP2010/007902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10807702 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2516627**

54 Título: **Medio de expansión para células madre CD34-negativas**

30 Prioridad:

23.12.2009 US 289796 P

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**APCETH GMBH & CO. KG (100.0%)
Max-Lebsche-Platz 30
81377 München, DE**

72 Inventor/es:

**ASEEVA, ELENA y
GÜNTHER, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

ES 2 657 840 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).

MEDIO DE EXPANSIÓN PARA CÉLULAS MADRE CD34-NEGATIVAS

Descripción

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente U.S. Núm. 61/289,796, presentada el 23 de Diciembre de 2009.

Antecedentes de la invención

10 Las células madre humanas no hematopoyéticas que se originan en la médula ósea y la sangre del cordón umbilical se utilizan cada vez más como células mesenquimales para las indicaciones regenerativas e inmunomoduladoras en pacientes. Se han realizado más de 80 ensayos clínicos en todo el mundo con células madre mesenquimales.

15 Casi todos los investigadores usan medio que contiene suero fetal bovino (SFB) como suplemento sérico estándar. El SFB es de origen bovino, puede transmitir EET (es decir, encefalopatía espongiforme transmisible) y estimula respuestas inmunitarias en el receptor. Las autoridades solo autorizan el uso de ganado libre de EEB en seres humanos (Nueva Zelanda) y los investigadores se dedican a esfuerzos para desarrollar enfoques alternativos para promover el crecimiento celular. Como las terapias basadas en células probablemente se utilizarán cada vez más en los próximos años, habrá una escasez de SFB.

20 Algunas compañías han desarrollado medios sin suero. Sin embargo, estos medios exhiben velocidades de crecimiento inferiores a la ideal, y la morfología y las propiedades de las células madre CD34-negativas derivadas de médula ósea en estos medios no se caracterizan tan extensamente como las de los medios que contienen SFB.

25 Los trombocitos humanos (es decir, plaquetas) han sido utilizados por otros investigadores, al igual que el Plasma Fresco Congelado (PFC), como componentes potenciadores del crecimiento. Las plaquetas y sus potenciales implicaciones para la medicina regenerativa son revisadas por separado por Stellos y Gawaz, y por Langer y Gawaz.

30 Las siguientes enseñanzas específicas en la técnica se observan con respecto a la expansión de células madre usando plaquetas o PFC. Schallmoser, et al. describe la expansión de células madre mesenquimales utilizando lisado de plaquetas. Capelli, et al. describe el uso de lisado de plaquetas humanas no filtrado para expandir y producir células estromales mesenquimales. Kocaoemer, et al. describe el uso de suero AB humano y plasma rico en plaquetas activado por trombina en células madre mesenquimales en expansión a partir de tejido adiposo. Muller, et al. describe las condiciones de cultivo sin suero animal para aislar y expandir células estromales mesenquimales multipotentes de la médula ósea humana, donde estas condiciones emplean tanto PFC como plaquetas. Blande, et al. describe la expansión de células madre mesenquimales del tejido adiposo en un medio sin suero animal suplementado con lisado de plaquetas humanas autólogas que se ha filtrado de forma estéril. Del mismo modo, Salvadè, et al. describe el uso de lisado de plaquetas en el cultivo de células estromales mesenquimales, en el que el lisado se filtra de forma estéril.

A pesar del conocido uso de lisado de plaquetas y PFC en el cultivo de células madre mesenquimales, todavía existe una necesidad insatisfecha de una forma más rápida, rentable y segura de cultivar tales células de una manera estable, preservando su capacidad para diferenciarse más tarde cuando lo deseen.

5 **Descripción de la invención**

La invención se refiere a un medio de crecimiento celular que comprende:

- a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 2% al 15% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- 10 b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- c) heparina a una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml del medio de crecimiento celular;
- d) L-glutamina a una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
- 15 e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células mamíferas, en el que el medio sin suero y bajo en glucosa constituye del 75% al 97% del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d);

en el que el término PFC se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de un plazo de 6 horas desde la recolección; en donde el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.

20 Esta invención también proporciona un suplemento de medio de crecimiento celular que comprende:

- (a) lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 17% al 94% del volumen total del suplemento de medio de crecimiento celular; y
- 25 (b) filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 6% al 83% del volumen total del suplemento de medio de crecimiento celular.

Esta invención divulga además un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado de plaquetas se prepara de acuerdo con las siguientes etapas:

- 30 (i) congelar concentrado de plaquetas, lisando así las plaquetas en el mismo;
- (ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
- (iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;
- (iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada
- 35 para sedimentar la materia sólida en su interior; y
- (v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores que 0.22 μm .

ES 2 657 840 T3

Esta invención divulga además un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC se prepara según las siguientes etapas:

- (i) descongelar PFC;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .

También se proporciona un kit adecuado para su uso en la expansión de células madre CD34-negativas humanas que comprende, en compartimentos separados:

- (a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, y
- (b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro,

en donde (i) el lisado constituye del 17% al 94% del volumen combinado de (a) y (b) y (ii) el filtrado PFC constituye del 6% al 83% del volumen combinado de (a) y (b).

Esta invención también proporciona una composición de materia que comprende (a) células madre CD34-negativas humanas y (b) cualquiera de las realizaciones del sustrato de crecimiento celular en cuestión.

Esta invención proporciona además un método para fabricar un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, que comprende las siguientes etapas:

- (i) congelar concentrado de plaquetas, lisando así las plaquetas en el mismo;
- (ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
- (iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;
- (iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada para sedimentar la materia sólida en su interior; y
- (v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores que 0,22 μm .

Esta invención proporciona además un método para preparar un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, que comprende las siguientes etapas:

- (i) descongelar PFC;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .

Esta invención también proporciona un método para fabricar un medio de crecimiento celular que comprende la etapa de combinar lo siguiente:

- 5 (a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 2% al 15% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- (b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- 10 (c) heparina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml del medio de crecimiento celular;
- (d) L-glutamina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
- (e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células mamíferas, en el que el medio sin suero y bajo en glucosa constituye del 75% al 97% del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d);
- 15 en el que el PFC se obtiene de la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de un plazo de 6 horas desde la recolección;

en donde el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.

20 Esta invención proporciona un método para expandir una población de células madre CD34-negativas humanas que comprende la etapa de incubar las células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular en cuestión.

Esta invención también proporciona una célula madre humana CD34-negativa (i) que tiene la capacidad de diferenciarse, y (ii) resulta de una expansión de una población de células madre humanas CD34-negativas, en donde la expansión comprende incubar la población de células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular en cuestión.

25

Finalmente, esta invención proporciona una población de células madre humanas negativas para CD34 (i) que tienen la capacidad de diferenciarse, y (ii) resultantes de una expansión de una población de células madre CD34-negativas humanas, en las que la expansión comprende la incubación de la población de células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular en cuestión.

30

Breve descripción de la figuras

Figura 1

Tiempo de duplicación de MSCs en medios de diferentes composiciones.

Figura 2

35 Tasa de proliferación de MSC en diferentes medios.

Figura 3

Dinámica del crecimiento de MSC en Bio-1.

Figura 4

Expresión de proteínas de superficie específicas de MSC.

Figura 5

Análisis de la población de MSC por citometría de flujo. Panel izquierdo: MSCs cultivadas en IMDM + 20% PFC; panel derecho: MSCs cultivadas en Bio-1.

5 Figura 6

Diferenciación inducida del crecimiento de MSC en Bio-1.

Figura 7

10 Tiempo de duplicación (días) de MSCs. Rojo (barras 4-6): tiempo de duplicación de las MSCs incubadas con PFC filtrado a través de al menos un filtro de 40 μm o filtros con un tamaño de poro más pequeño. Azul (barras 1-3): tiempo de duplicación de MSC incubadas con PFC que no se filtró o se filtró solo a través de 100 μm .

Figura 8

15 Cantidad de duplicaciones logradas después de 12 días. Rojo (barras 4-6): duplicaciones logradas por MSCs incubadas con PFC filtrado a través de un filtro de al menos 40 μm o filtros con un tamaño de poro más pequeño. Azul (barras 1-3): duplicaciones logradas por MSCs incubadas con PFC que no se filtró o se filtró solo a través de 100 μm .

Figura 9

El análisis microscópico se realizó después de 4 días de cultivo. Filtrado de PFC a través de filtros 40 μm , 40 μm o 0,22 μm aumentaron significativamente la tasa de crecimiento de las MSCs. El filtrado a través de 100 μm mejoró el rendimiento sólo ligeramente.

20 Figura 10

Tiempo de duplicación (días) de MSCs. El tiempo de duplicación de las MSC cultivadas en medio con PFC pasado a través de un filtro de 40 μm (rojo, barras 4-7) es aproximadamente la mitad que las MSCs incubadas con PFC sin filtrar (azul; barras 1-3).

Figura 11

25 Análisis microscópico después de 9 días de cultivo. MSCs de pasajes tardíos se utilizaron para este análisis, lo que explica un tiempo de duplicación largo y una morfología aplanada típica de MSCs senescentes (imágenes 1-4). Sin embargo, la incubación en medio con PFC filtrado no solo aumentó la tasa de crecimiento celular, sino que también mejoró la morfología de las células (imágenes 5-8).

Figura 12

30 Control del crecimiento de MSC con diferentes preparaciones de TK y PFC. TK y PFC se sometieron a diferentes etapas de filtración. Las fotografías microscópicas muestran el crecimiento celular después de 7 días de cultivo. El medio preparado con TK y PFC ambos filtrados a través de filtros de 40 μm y 0,20 μm proporcionó el crecimiento de MSC más eficiente (muestra 2), también cuando el medio resultante se filtró nuevamente a través de 0,20 μm (muestra 5). En todos los casos, el crecimiento celular se promovió
35 suficientemente.

Figura 13

Análisis de CD41⁺ en MSCs cultivadas en Bio-1 preparadas con diferentes etapas de filtración. Las MSC de los donantes AP00029, AP00042 y AP00045 se usaron para el análisis. (A) 1- control; 2 - TK 0,8 μm / 0,2 μm + PFC; 3 - TK + PFC 0,8 μm / 0,2 μm ; 4 - TK 0,8 μm / 0,2 μm + PFC 0,8 μm / 0,2 μm . (B) 1- control; 2 - TK 8

μm + PFC; 3 - TK + PFC 8 μm ; 4 - TK 8 μm + PFC 8 μm . (C) 1- control; 2 - TK 8 μm / 0,8 μm / 0,2 μm + PFC; 3 - TK + PFC 8 μm / 0,8 μm / 0,2 μm ; 4 - TK 8 μm / 0,2 μm + PFC 8 μm / 0,8 μm / 0,2 μm . (D) 1 - control; 2 - TK 0,8 μm / 0,2 μm + PFC 0,8 μm / 0,2 μm + Bio-1 0,8 μm / 0,2 μm ; 3 - TK 8 μm / 0,8 μm / 0,2 μm + PFC 8 μm / 0,8 μm / 0,2 μm + Bio-1 0,8 μm / 0,2 μm .

5 Figura 14

Análisis del crecimiento de MSC en Bio-1 con (1) PFC estándar y (2) PFC sin crioprecipitado.

Descripción detallada de la invención

10 Esta invención proporciona un nuevo medio de crecimiento que permite la expansión inesperadamente rápida de células madre CD34-negativas humanas. Sin embargo, las células madre expandidas no se diferencian hasta que de otro modo se las induce a hacerlo. Por lo tanto, el medio de crecimiento de esta invención, y sus métodos relacionados, constituyen una mejora significativa en la capacidad para generar rápida, segura y económicamente números clínicamente significativos de células madre CD34-negativas para uso en el tratamiento de enfermedades.

15 Específicamente, esta invención proporciona un medio de crecimiento celular que comprende:

- (a) un lisado de plaquetas humanas (es decir, trombocitos) libre de materia sólida mayor que 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 2% al 15% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- (b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% del volumen total del medio de crecimiento celular;
- 20 (c) heparina a una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml del medio de crecimiento celular;
- (d) L-glutamina a una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
- (e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células mamíferas, en el que el medio sin suero y bajo en glucosa constituye del 75% al 97% del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d);
- 25

en el que el término PFC se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18°C dentro de un plazo de 6 horas de la recolección; en donde el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.

30 Las siguientes son algunas de las realizaciones preferidas de este medio de crecimiento celular: (i) el lisado constituye del 3% al 8%, del 5% al 7%, y preferiblemente 6%, del volumen total del medio de crecimiento celular; (ii) el filtrado de PFC constituye del 2% al 7%, del 4% al 6%, y preferiblemente 5%, del volumen total del medio de crecimiento celular; (iii) la heparina está en una concentración de 0,8 U/ml a 1,2 U/ml, y preferiblemente 1 U/ml, del medio de crecimiento celular; (iv) L-glutamina está en una concentración de 0,5 mM a 10 mM, y preferiblemente 2 mM; y (v) el medio sin suero, con bajo contenido de glucosa (1 mg/ml) es DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) bajo en glucosa y que contiene L-glutamina y constituye del 85% al 93%, del 87% al 91%, y preferiblemente 89%, del volumen total del medio de crecimiento celular.

35 En una realización preferida adicional, las células madre CD34-negativas expandidas tienen el fenotipo CD34⁻/CD45⁻/CD73⁺/CD105⁺/CD90⁺. Por este fenotipo, se entiende que los marcadores CD34 y CD45 aparecen

en $0\% \pm 10\%$ (y preferiblemente $\pm 0,5\%$) de células expandidas tras la prueba de tales marcadores (usando, por ejemplo, análisis de citometría de flujo). Del mismo modo, los marcadores CD73, CD105 y CD90 aparecen en $100\% \pm 10\%$ (y preferiblemente $\pm 0,5\%$) de células expandidas tras la prueba de tales marcadores.

5 Como se usa en el presente documento, "célula madre CD34-negativa" significará una célula madre que carece de CD34 en su superficie. Las células madre CD34-negativas pueden derivarse de tejidos tales como hueso, cordón umbilical y tejido adiposo, por ejemplo. Las células madre CD34-negativas, y los métodos para aislarlas, se describen, por ejemplo, en Lange C. et al., Accelerated and safe expansión of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. J. Cell Physiol. 25 Abril del 2007. [Epub antes de impresión].

10 En una realización de la invención, el término plasma fresco congelado (PFC) se refiere a la porción líquida de sangre humana que se ha congelado y conservado. En particular, el término PFC, en una realización, se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de un plazo de 6 horas desde la recolección.

15 El medio sin suero y bajo en glucosa adecuado para el crecimiento de células mamíferas puede comprender, por ejemplo, diversos aminoácidos, vitaminas, sales y otros compuestos. En la realización preferida de la invención, el medio sin suero y bajo en glucosa es (DMEM) bajo en glucosa, que también puede incluir L-glutamina. A continuación, en las Tablas 1 y 2, como ejemplos, se encuentran dos formulaciones de medio de crecimiento casi idénticas.

20

Tabla 1

Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) Glucosa Baja

DMEM contiene, mg/ml:

Sales inorgánicas:

0,0002 mg CaCl
 0,0001 mg Fe(NO₃)x9H₂O
 0,0004 mg KCl
 0,000977 mg MgSO₄
 0,0064 mg NaCl
 0,000125 mg NaH₂PO₄ x 2 H₂O
 0,0037mg NaHCO₃

Aminoácidos:

0,000084 mg L-Arginina x HCl
 0,000048 mg L-Cistina
 0,000584 mg L-Glutamina

ES 2 657 840 T3

(continuación)

Aminoácidos:

0,000030 mg Glicina
0,000042 mg L-Histidina x HCl x H₂O
0,000105 mg L-Isoleucina
0,000105 mg L-Leucina
0,000146 mg L-Lisina x HCl
0,00003 mg L-Metionina
0,000066 mg L-Fenilalanina
0,000042 mg L-Serina
0,000095 mg L-Treonina
0,000016 mg L-Triptófano
0,000072 mg L-Tirosina
0,000094 mg L-Valina

Vitaminas:

0,000004 mg D-Pantotenato-Cálcico
0,000004 mg Cloruro de colina
0,000004 mg Folato
0,0000072 mg Mioinositol
0,000004 mg Nicotinamida
0,000004 mg Piridoxal x HCl
0,0000004 mg Riboflavina
0,000004 mg Tiamina x HCl

Otros componentes:

0,001 mg D-Glucosa
0,000015 mg Rojo de fenol
0,00011 mg Piruvato sódico
0,9862567 mg H₂O

Agua:

0,9862567 mg

Tabla 2

Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)

Glucosa baja

Fórmula compuesto mg/L

Parte A: Sales inorgánicas

Cloruro de calcio (anhidro)	200,00
Nitrato de hierro	0,10
Sulfato magnésico	200,00
Cloruro potásico	400,00
Bicarbonato sódico	3700,00
Cloruro sódico	6400,00
Fosfato sódico, H ₂ O	125,00

ES 2 657 840 T3

(continuación)

Parte B: Otros componentes

D-Glucosa 1000.00	1000,00
Rojo de fenol 15.00	15,00
Piruvato sódico 110.00	110,00

Parte C: Aminoácidos

	84,00
	48,00
L-Hidrocloruro de arginina	584,00
L-Cistina	30,00
L-Glutamina	42,00
Glicina	105,00
L-Clorhidrato de histidina	105,00
L-Isoleucina	146,00
L-Leucina	30,00
L-Lisina HCl	66,00
L-Metionina	42,00
L-Fenilalanina	95,00
L-Serina	16,00
L-Treonina	72,00
L-Triptófano	94,00
L-Tirosina	
L-Valina	

Parte D: Vitaminas

	4,00
D-Pantotenato cálcico	4,00
Cloruro de colina	7,20
i-Inositol	4,00
Nicotinamida	4,00
Clorhidrato de piridoxina	4,00
Clorhidrato de tiamina	4,00
Ácido fólico	0,40
Riboflavina	

[pH 7,0 Osmolaridad: 324-333 mOsm]

- Las plaquetas humanas (es decir, trombocitos) se pueden obtener a partir de sangre completa o de aféresis. Las plaquetas se pueden derivar de un solo donante o donantes agrupados combinados. En la realización preferida, se usa aféresis de único donante. Del mismo modo, el PFC puede derivarse de sangre total o de aféresis. Preferiblemente, la aféresis se usa para preparar PFC. El concentrado de plaquetas, así como el concentrado de PFC, pueden prepararse de acuerdo con métodos rutinarios, como los descritos en "Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components", Council of Europe, Recommendation; y "Transfusionsgesetz and Richtlinien zur Hämotherapie" (Alemania).
- 5
- 10 En una realización preferida, la unidad de plaquetas utilizada tiene las siguientes características: el volumen es de 200-300 ml; el contenido de trombocitos es de $2-4 \times 10^{11}$ /unidad; contenido de eritrocitos es $< 3 \times 10^9$ /unidad; el contenido de leucocitos es $< 1 \times 10^6$ /unidad de plaquetas; y el donante es negativo para anticuerpos anti-HLA (importante para evitar complicaciones inmunitarias). Estas son las características según la licencia del fabricante. También se pueden usar otras unidades de plaquetas.

En la realización preferida del medio de crecimiento celular en cuestión, el lisado de plaquetas de la parte (a) se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:

- (i) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;
- (ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
- 5 (iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;
- (iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada para sedimentar la materia sólida en su interior; y
- (v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores que 0.22 μm .

En una realización de esta invención, la etapa de filtración (v) se omite.

- En una realización, el concentrado de plaquetas humanas de la etapa (i) se prepara mediante: centrifugación de plaquetas y, por lo tanto, granulación de las mismas; separación de las plaquetas peletizadas de la fase líquida; y reconstitución de las plaquetas resultantes en PFC.

- Las siguientes son ciertas realizaciones preferidas adicionales de este proceso para preparar el lisado de plaquetas: el concentrado de plaquetas humanas congeladas se realiza entre - 20 y - 80 °C, y preferiblemente a - 80 °C; la descongelación de las plaquetas lisadas se realiza entre 18 y 37 °C, y preferiblemente a 37 °C; la centrifugación de las plaquetas lisadas descongeladas se realiza a entre 9.000 x g y 55.000 x g, y preferiblemente a 10.000 x g, durante entre 10 y 20 minutos, y preferiblemente 20 minutos; la recentrifugación del sobrenadante de la etapa (iii) se realiza entre 3.000 x g y 5.000 x g, y preferiblemente a 4.000 x g, durante 10 minutos; y el filtrado del sobrenadante de la etapa (iv) se realiza tres veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, concretamente 40 $\mu\text{m} \pm 5 \mu\text{m}$, 5 $\mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$ y 0,22 μm .

- Las plaquetas reconstituidas pueden someterse luego a la etapa (i) mencionada anteriormente, la etapa de congelación. Tal procedimiento puede lograr una buena compatibilidad del grupo sanguíneo entre los antígenos del grupo sanguíneo y las isoaglutininas en el plasma. El PFC usado para reconstituir las plaquetas en el paso (ic) puede prepararse de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos a continuación.

Además, en la realización preferida del medio de crecimiento celular sujeto, el filtrado de PFC de la parte (b) se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:

- 30 (i) descongelar PFC humano;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .

En una realización de esta invención, se omite la etapa de filtrado (iii).

En otra realización de esta invención, el filtrado de PFC de la parte (b) se prepara por: (i) descongelación del PFC humano (ii) congelado del PFC humano descongelado; (iii) descongelación del PFC humano resultante; y (iv) centrifugación del PFC descongelado resultante a una velocidad y durante una duración adecuada para

separar las porciones líquida y sólida del mismo. Preferiblemente, el PFC descongelado de la etapa (iii) se congela y se descongela al menos una vez más antes de la etapa de centrifugación (iv). Además, en una realización, se omite una filtración de la parte líquida resultante de la etapa (iv).

5 Las siguientes son ciertas realizaciones preferidas de este proceso para preparar el filtrado de PFC: la descongelación del PFC se realiza a entre 18 y 37 °C, y preferiblemente a 37 °C; la centrifugación del PFC descongelado se realiza a entre 9.000 x g y 55.000 x g, y preferiblemente a 10.000 x g, durante entre 10 y 20 minutos, y preferiblemente 20 minutos; y el filtrado de la porción líquida de la etapa (ii) se realiza tres veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, concretamente 40 µm ± 5 µm, 5 µm ± 1 µm y 0,22 µm.

10 Idealmente, el medio de crecimiento celular en cuestión está libre de suero animal. Esto reduce las complicaciones que pueden surgir cuando se introducen antígenos no humanos en un sujeto humano.

Preferiblemente, en el medio de crecimiento celular en cuestión, el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC se corresponden con respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Rh. Es decir, el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC se derivan preferiblemente de sujetos que tienen estos mismos antígenos de grupo sanguíneo (por ejemplo, tanto el lisado como el filtrado se derivan de sujetos O⁺/ Rh⁺). Este tema se analiza con más detalle a continuación.

Esta invención también proporciona un suplemento de medio de crecimiento celular que comprende:

(a) lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 µm de diámetro, en el que el lisado constituye del 17% al 94% del volumen total del suplemento de medio de crecimiento celular; y
(b) filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro,
20 en el que el filtrado de PFC constituye del 6% al 83% del volumen total del suplemento de medio de crecimiento celular.

Este suplemento de medio de crecimiento celular se usa de hecho como un "concentrado" para la adición a un medio de crecimiento estándar como DMEM. Por lo tanto, el suplemento preferiblemente produce las concentraciones preferidas de lisado de plaquetas y filtrado de PFC discutido anteriormente (por ejemplo, el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC constituyen 54,5% y 45,5% del suplemento, respectivamente).

En una realización, el suplemento de medio de crecimiento celular en cuestión comprende adicionalmente heparina.

Preferiblemente, en el suplemento del medio de crecimiento celular sujeto, el lisado de plaquetas de la parte (a) se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:

30 (i) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;
(ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
(iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;
(iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada
35 para sedimentar la materia sólida en su interior; y
(v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 mm, y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores que 0,22 µm.

En una realización de esta invención, se omite la etapa de filtrado (v).

También se prefiere en el suplemento de medio de crecimiento celular sujeto, el filtrado de PFC de la parte (b) se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:

- (i) descongelar PFC humano;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .

En una realización de esta invención, se omite la etapa de filtrado (iii).

- 10 Como con todas las realizaciones del medio de crecimiento sujeto, el suplemento de medio de crecimiento celular idealmente también está libre de suero animal.

También se prefiere en el suplemento de medio de crecimiento celular en cuestión el hecho de que el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC coincidan con respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Rh. De nuevo, esto es como se discutió anteriormente con respecto al medio de crecimiento del sujeto.

- 15 Esta invención describe además un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en donde el lisado de plaquetas se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:

- (i) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;
- (ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
- (iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;
- (iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada para sedimentar la materia sólida en su interior; y
- (v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores que 0,22 μm .

En una realización de esta invención, se omite la etapa de filtración (v).

Esta invención divulga aún más un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC se prepara según las siguientes etapas:

- (i) descongelar PFC humano;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante un tiempo adecuados para separar las partes líquida y sólida en el mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, en donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .

- 35 También se proporciona un kit adecuado para usar en la expansión de células madre CD34-negativas humanas que comprende, en compartimentos separados:

(a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, y

(b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro,

en donde (i) el lisado constituye del 17% al 94% (y preferiblemente el 54,5%) del volumen combinado de (a) y (b) y (ii) el filtrado de PFC constituye de 6% a 83% (y preferiblemente 45,5%) del volumen combinado de (a) y (b).

5

En una realización del kit en cuestión, el kit comprende, en compartimentos separados:

(a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro,

(b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro, y

10 (c) heparina,

en donde (i) el lisado constituye de 17% a 94% (y preferiblemente 54,5%) del volumen combinado de (a) - (c) y (ii) el filtrado de PFC constituye de 6% a 83% (y preferiblemente 45,5%) del volumen combinado de (a) - (c).

15

Esta invención también proporciona una composición de materia que comprende (a) células madre CD34-negativas humanas y (b) cualquiera de las realizaciones del sujeto del medio de crecimiento celular.

En el caso de que esta composición de medio y células madre se administre a un sujeto, tal como se prevé en esta invención, se prefiere que la composición sea inmunocompatible con el tipo de sangre del paciente. A este respecto, existen varias realizaciones preferidas en relación con el uso clínico de la composición de materia instantánea. En el primero, el lisado de plaquetas es de tipo O (donante universal), el filtrado PFC es de tipo AB (donante universal) y la composición se administra a un paciente que tiene cualquier tipo de sangre (es decir, O, A, B o AB). En la segunda realización preferida, el lisado de plaquetas, el filtrado de PFC y los pacientes tienen todos el mismo tipo de sangre. En la tercera realización preferida, el filtrado de PFC es de tipo AB, y el tipo de lisado de plaquetas y el tipo de paciente son iguales y pueden ser de cualquier tipo sanguíneo (por ejemplo, el filtrado de PFC es de tipo AB y el tipo de lisado de plaquetas y el tipo de paciente son O). Finalmente, si el paciente es del tipo O, el PFC utilizado puede ser de cualquier tipo de sangre. Con respecto al factor Rh, se prefiere, pero no es necesario, que el tipo de paciente coincida con el del filtrado de PFC y el lisado de plaquetas.

20

25

Esta invención proporciona además un método para fabricar un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro, que comprende las siguientes etapas:

30

(i) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;

(ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;

(iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar la materia sólida en su interior;

35

(iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada para sedimentar la materia sólida en su interior; y (v) filtrar el sobrenadante de la etapa (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 µm, y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 µm.

En una realización de esta invención, se omite la etapa de filtrado (v).

Esta invención proporciona además un método para preparar un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro, que comprende las siguientes etapas:

- (i) descongelar PFC humano;
- (ii) centrifugar el PFC descongelado a una velocidad y durante un tiempo adecuados para separar las partes líquida y sólida en el mismo; y
- (iii) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, en donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 µm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 µm.

Alternativamente, el filtrado de PFC de la parte (b) del medio de crecimiento celular se prepara de acuerdo con los siguientes pasos: (i) descongelar PFC humano; (ii) congelar el PFC humano descongelado; (iii) descongelar el PFC humano del paso (ii); y (iv) centrifugar el PFC descongelado de la etapa (iii) a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida de la misma.

Durante el método de preparación del PFC, el PFC descongelado de la etapa (iii) se puede congelar y descongelar al menos una vez más antes de la etapa de centrifugación (iv). En particular, el PFC se puede congelar a una temperatura inferior o igual a -35 °C y además se puede descongelar a temperaturas de 5 °C ± 3 °C durante la noche, lo que da como resultado la aglomeración de factores, que normalmente conducirían a una aglutinación de MSCs cultivadas.

En una realización adicional de este método de la invención, la etapa de centrifugación puede realizarse a 4.000 x g durante al menos 10 minutos para precipitar los factores aglomerados mencionados anteriormente.

Cuando se usan las etapas de descongelación y congelación como se describió anteriormente, se puede omitir una etapa de filtrado de la porción líquida que resulta de la etapa de centrifugación (iv). El tiempo de duplicación de MSCs cultivadas en el medio preparado utilizando el PFC pretratado a través del paso de eliminación de crioprecipitado es comparable al tiempo de duplicación en el medio preparado mediante el paso de filtración del componente de PFC. Esta invención también proporciona un método para fabricar un medio de crecimiento celular que comprende la etapa de combinar lo siguiente:

- (a) lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 µm de diámetro, en el que el lisado constituye del 2% al 15% (y preferiblemente 6%) del volumen total del medio de crecimiento celular;
- (b) filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano exento de materia sólida mayor de 0,22 µm de diámetro, donde el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% (y preferiblemente 5%) del volumen total del medio de crecimiento celular;
- (c) heparina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml (y preferiblemente 1 U/ml) del medio de crecimiento celular;
- (d) L-glutamina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
- (e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células de mamífero, en el que el medio sin suero y bajo en glucosa constituye de 75% a 97% (y preferiblemente 89%) del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d);

en el que el PFC se obtiene de la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de las 6 horas de la recolección;

en donde el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.

Esta invención proporciona un método para expandir una población de células madre humanas CD34-negativas que comprende la etapa de incubar las células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular en cuestión. Preferiblemente, la temperatura adecuada está entre 36 y 38 °C, y preferiblemente a 37 °C.

- 5 Esta invención también proporciona una célula madre humana CD34-negativa (i) que tiene la capacidad de diferenciarse, y (ii) resulta de una expansión de una población de células madre CD34-negativas humanas, en donde la expansión comprende incubar la población de células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular sujeto.

- 10 Finalmente, esta invención proporciona una población de células madre CD34-negativas humanas (i) que tienen la capacidad de diferenciarse, y (ii) resultantes de una expansión de una población de células madre CD34-negativas humanas, en donde la expansión comprende la incubación de la población de células madre a una temperatura adecuada en el medio de crecimiento celular en cuestión.

- 15 Esta invención se entenderá mejor con referencia a los datos experimentales que siguen, pero los expertos de la materia apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son solo ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen a continuación.

Datos Experimentales

A. Preparación y uso de materiales relacionados con células madre

Plasma fresco congelado (producto medicinal)

- 20 El plasma congelado fresco es un componente de plasma humano usado para transfusión o procesos de fraccionamiento adicionales y preparado por sangre completa o por plasma recogido por aféresis. El PFC contiene niveles plasmáticos normales de factores de coagulación estables, albúmina e inmunoglobulinas. Los factores de coagulación lábiles incluyen Factor VIIIc.

- 25 La pureza del PFC se consigue mediante recogida mediante aféresis. Las pruebas de anticuerpos HLA y HPA se pueden realizar en donantes individuales para reducir el posible riesgo de aloinmunización. Se usa plasma compatible con ABO (AB Rh⁺ como donador universal o compatible ABO).

El PFC se usa para la expansión de MSCs en una concentración muy baja durante el cultivo. Para disminuir aún más el riesgo de transmisión de patógenos, los donantes de PFC se prueban idealmente para detectar patógenos y se inmunizan contra la hepatitis B.

- 30 El riesgo de aloinmunización del paciente y la transmisión de patógenos se ve reducido por las medidas descritas.

Lisado de trombocitos (derivado de plaquetas: producto medicinal)

- 35 El lisado de trombocitos se deriva de plaquetas obtenidas por aféresis, idealmente de un solo donante. La unidad de plaquetas aplicada está libre de eritrocitos contaminantes y contiene un número muy bajo de leucocitos (< 105 /unidad). El lisado de plaquetas consiste en un lisado libre de células que soporta el crecimiento y la pureza de las MSC de manera significativa. 1 ml del lisado corresponde a $6,5 \times 10^8$ – $2,0 \times 10^9$ plaquetas.

El posible riesgo de aloinmunización se reduce mediante el uso de productos de aféresis de único donante pobre en leucocitos. Aunque las unidades de plaquetas no contienen eritrocitos (o contienen solo cantidades muy bajas), solo se usan plaquetas O Rh⁺ o unidades combinadas.

5 El posible riesgo de transmisión de patógenos se reduce mediante el uso de plaquetas de donante único y la prueba de CMV. Se pueden realizar pruebas adicionales para patógenos como Parvo B19, EBV o toxoplasmosis si se desea.

B. Desarrollo y prueba de la composición de Bio-1 (es decir, medios que contienen lisado de plaquetas y filtrado de PFC)

10 Se comparó el cultivo de MSC en las siguientes condiciones: (a) IMDM + 20% de SBF como estándar; (b) DMEM bajo en glucosa suplementado con 3% de lisado de plaquetas (= TK) y 5% de PFC; y (c) DMEM bajo en glucosa complementado con 6% de lisado de plaquetas (= TK) y 5% de PFC.

Tasa de proliferación MSC

15 Las tasas de proliferación de MSCs de cuatro donantes se examinaron en las tres condiciones elegidas. Las MSC se cultivaron y pasaron en la misma densidad inicial y se determinó la velocidad de proliferación durante el paso de cada etapa.

El tiempo de duplicación se calculó como $T_d = t * \log(2) / \log(q_2/q_1)$, donde T_d es el tiempo de duplicación, q_1 - cantidad de células iniciales, q_2 - cantidad de células finales, t - duración del cultivo, días.

20 La Figura 1 muestra el tiempo requerido para una duplicación de MSC en las tres condiciones examinadas. Las MSCs cultivadas en medio que contiene SBF muestran un mayor tiempo de duplicación ($2,886 \pm 0,43$ días) que las MSC cultivadas en DMEM + 6% de TK y 5% de PFC ($1,78 \pm 0,23$ días). La velocidad de crecimiento de las MSCs cultivadas con menos lisado de plaquetas (DMEM + 3% TK y 5% PFC) es intermedia entre las dos ($2,4 \pm 0,32$ días). Esta diferencia es estadísticamente significativa entre IMDM + 20% de SBF y DMEM + 6% de TK y 5% de PFC y se evalúa una tendencia reproducible cuando se comparan los tres medios.

25 La tasa de proliferación de las MSCs en medios que contienen TK normalizados a la del medio que contiene SBF se representa en la Figura 2.

La composición del medio DMEM + 6% de TK y 5% de PFC (denominado Bio-1) se eligió para un análisis detallado adicional.

30 La expansión de MSCs en Bio-1 se estudió durante un período de cultivo prolongado. Las células de la médula ósea eran cultivadas en Bio-1 (10 donantes) o en IMDM + 20% de SBF (6 donantes) y se obtuvo un cultivo puro de MSC (confirmado por los ensayos que se muestran a continuación). Las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 75% -85%, se contaron durante los pases y se volvieron a cultivar en la misma densidad inicial. Las duplicaciones de células se calcularon como t/T_d , donde t es la duración del cultivo entre pasajes (días) y T_d es el tiempo de duplicación.

35 Debido a una gran diferencia en la velocidad de crecimiento, las MSCs cultivadas en dos medios no pudieron pasarse al mismo tiempo. Por lo tanto, la dinámica del crecimiento de MSC (Figura 3) se presenta como una línea de tendencia construida sobre puntos de datos únicos que representan la cantidad de duplicaciones de células alcanzadas en un período de tiempo entre pasajes. Como la siembra se realizó a baja densidad celular,

no se analizaron más pasos de etapas después de 45 días de cultivo porque las MSC entraron en senescencia (datos no mostrados).

Caracterización de marcadores de superficie específicos de MSC en diferentes medios

5 Se realizó un análisis de citometría de flujo de la expresión del marcador de superficie de las MSCs cultivadas en las condiciones anteriores. Se usó una combinación estándar de marcadores, descrita como indicativa del fenotipo MSC y aceptada como criterio ISTH (Dominici, Le Blanc et al., 2006). Se sabe que las MSCs carecen de la expresión de marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, mientras que CD73, CD90 y CD105 están altamente expresados. Los datos obtenidos de la comparación de 5 donantes se resumen en la Tabla 3.

10

Tabla 3

Marcadores de superficie	IMDM + 20%FBS	Bio-1
CD34	0.62 ± 0.82	0.20 ± 0.27
CD45	0.38 ± 0.56	0.08 ± 0.03
CD73	99.06 ± 1.59	99.87 ± 0.24
CD90	94.17 ± 2.72	99.92 ± 0.05
CD105	99.28 ± 1.07	99.83 ± 0.18

El cultivo en medios que contienen TK y PFC mejoró claramente las características fenotípicas de los cultivos obtenidos. La tendencia se observó para la expresión de todos los marcadores analizados (ver Figura 4).

Viabilidad celular y morfología

15 La viabilidad del MSC cultivado en Bio-1 se determinó mediante tinción con 7-AAD en análisis FACS. La viabilidad promedio calculada a partir del análisis de MSCs de 11 donantes fue 97.61 ± 1.26%.

Además, parece que las MSC cultivadas en Bio-1 representan una población de células más homogénea en términos de tamaño y granularidad, y son de menor tamaño cuando se comparan con las MSC cultivadas en medio que contiene SBF (véase la Figura 5), que es considerado como un estado más fisiológico de MSCs.

20 Esta observación fue confirmada por análisis microscópico (datos no mostrados).

Análisis funcional de MSCs cultivadas en Bio-1

Se demostró la clonogenicidad de las MSC en un ensayo de CFU-F (unidad de formación de colonias de fibroblastos) (datos no mostrados). Se podría inducir la diferenciación de MSC hacia linajes adipogénicos, osteogénicos y condrogénicos (ver Figura 6).

25 **C. Desarrollo y prueba adicionales de la composición Bio-1**

En las siguientes pruebas, métodos de preparación para dos componentes Bio-1, lisado de plaquetas (TK) y plasma congelado fresco (PFC) se mejoraron aún más. El objetivo de la mejora fue eliminar del medio todas las partículas mayores de 0,22 µm de tamaño y obtener una solución clara sin precipitados que normalmente se puede ver en un medio que tiene TK y PFC.

ES 2 657 840 T3

Los componentes de partida se prepararon de la siguiente manera:

El lisado de plaquetas (TK) se obtuvo mediante congelación (-20 °C o -80 °C) y descongelación del concentrado de plaquetas, centrifugado a 10.000 x g durante 20' y a 4.000 x g durante 10' a 18 °C. El sobrenadante resultante se usó.

5 El PFC se descongeló después del almacenamiento a < - 35 °C.

En todos los experimentos descritos a continuación, los componentes se añadieron a DMEM bajo en glucosa complementado con L-glutamina y heparina en una concentración de 6% de TK y 5% de PFC.

10 En la primera prueba, el medio se preparó como anteriormente y se pasó a través de un filtro de 0,22 µm directamente. Las MSC de tres donantes se incubaron en el medio filtrado de forma estándar. El crecimiento celular se detuvo y después de dos semanas de cultivo, el medio se cambió por uno no filtrado, después de lo cual se reanudó el crecimiento celular (datos no mostrados).

En pruebas adicionales, los componentes de partida se sometieron a etapas de centrifugación y filtración por separado y se añadieron al medio después. Se realizó un análisis visual de la claridad media (datos no mostrados) y se controló la tasa de crecimiento de MSC.

15 Mejora de la preparación de PFC

El método de preparación de TK permaneció sin cambios. La preparación de PFC fue variada de la siguiente manera:

1. PFC 4000 x g
2. PFC 4000 x g + 100 µm
- 20 3. PFC 100 µm
4. PFC 40 µm
5. PFC 40 µm + 0.22 µm
6. PFC 40 µm + 0.45 µm

25 Se prepararon los medios y las MSC se incubaron durante 12 días. Las células cultivadas en muestras medianas 4, 5 y 6 alcanzaron un 85% de confluencia después de 4 días y se pasaron a otra parte. Las MSC se contaron después de la tripsinación y se estimó la tasa de crecimiento (Figuras 7-9).

Mejora de la preparación de TK

30 Se realizó la comparación entre el crecimiento de MSC en TK preparado de una manera convencional y TK adicionalmente pasado a través de un filtro de 0,45 µm. Las preparaciones de PFC variaron como se indica a continuación. Se estimaron los tiempos de duplicación de las MSC cultivadas en estos medios y se realizó un análisis microscópico (Figuras 10-12).

35 Se ensayó el efecto de la filtración de TK a través de poros más pequeños o combinaciones de diferentes filtros (8 µm, 0,8 µm y 0,2 µm). Ninguna de las combinaciones probadas cambió significativamente la tasa de crecimiento celular (datos no mostrados). Sin embargo, el medio resultante estaba macroscópicamente libre de partículas y más transparente, especialmente cuando se usaron filtros de 0,8 µm y 0,2 µm. Se observó menos agregación en la suspensión celular después de la tripsinación de células cultivadas en medio filtrado en comparación al medio estándar, debido a la ausencia de sedimentos de plaquetas.

Además, la eficacia de la filtración se puede controlar mediante citometría de flujo de células CD41⁺. En TK sin filtrar, las membranas plaquetarias restantes tienen la capacidad de anclar MSC, lo que da como resultado una señal CD41⁺. Esta señal se elimina en su mayor parte mediante pasos de filtración con poros pequeños.

5 Un ejemplo de esto se presenta en la Figura 13. Se realizaron diferentes etapas de filtración con TK o PFC o ambos (Figura 13, A-C). Posteriormente, el medio resultante se sometió a filtración (Figura 13, D). Se señala que todas las variaciones del medio estudiadas sustentaron suficientemente el crecimiento celular (datos no mostrados). En todas las pruebas, el control fue el estándar Bio-1 preparado sin pasos de filtración adicionales.

10 La filtración de TK a través de 0,8 µm y poros de 0,2 µm, solo o en combinación con etapas de filtración de PFC, dio como resultado una disminución significativa de la señal de CD41⁺ (Figuras 13A y C). Además, el nivel de este efecto parecía depender de la eficiencia de la filtración, ya que la filtración posterior de TK a través de 0,8 µm y 0,2 µm produjo una disminución de CD41⁺ más pronunciada que la filtración a través de poros de 0,2 µm (comparar Figura 13C, 2 y 4). Esto es respaldado por los resultados presentados en la Figura 13D. La filtración a través de 8 µm no condujo a una reducción significativa de la señal CD41⁺ y sirvió
15 únicamente para eliminar partículas de mayor tamaño y así facilitar la posterior filtración a través de poros más pequeños. Como se esperaba, la filtración de PFC no mostró ninguna diferencia con respecto a la señal CD41⁺.

Optimización adicional: preparación modificada de PFC

20 El objetivo de la siguiente etapa fue eliminar los factores de coagulación del PFC y evitar la coagulación eventual del medio y la agregación de células, así como la precipitación de los residuos de lisado de plaquetas. Para este propósito, el PFC se congeló a < - 35 °C y se descongeló a 5 ± 3 °C durante la noche. Estos pasos se repitieron una vez más, seguido de la centrifugación del PFC a 4000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante (PFC libre de crioprecipitado) se usó para la preparación de Bio-1. La comparación del crecimiento de MSC en un estándar Bio-1 y en Bio-1 con PFC sin crioprecipitado se presenta en la Figura 14.
25 Los tiempos de duplicación alcanzados por las células en ambas variaciones medianas estudiadas fueron comparables, con un crecimiento ligeramente mejorado en la PFC libre de crioprecipitado. Este medio también estaba prácticamente libre de partículas contaminantes, por lo que no se necesitó filtración adicional de PFC.

Reconstitución del pellet de plaquetas en PFC con una subsiguiente preparación de suplemento de medio Bio-1

30 Para lograr la máxima compatibilidad del grupo sanguíneo con respecto a los antígenos del grupo sanguíneo y las isoaglutininas en el plasma como se describió anteriormente y excluir cualquier incompatibilidad eventual entre los suplementos del medio, puede ser necesario un paso adicional en la preparación del TK en algunos casos. Esto puede desempeñar un papel cuando el concentrado de plaquetas se recoge en plasma autólogo que contiene isoaglutininas. Debe considerarse la compatibilidad con respecto a isoaglutininas de PFC y
35 plasma del concentrado de trombocito.

Para esto, las plaquetas se pueden recoger por centrifugación a 2000 x g por 10 'o 5000 x g por 6' de manera análoga a las plaquetas lavadas. El sedimento se recoge y reconstituye en PFC (estándar, filtrado o exento de crioprecipitado) y se congela a ≤ - 20 °C. Después de los pasos de preparación se puede realizar como se describe anteriormente para TK.

El suplemento se puede agregar al medio basal (como DMEM o α -MEM). El volumen final del suplemento y la cantidad añadida al medio basal se pueden ajustar dependiendo de la composición final deseada. Por ejemplo, si se elige el 5% de concentrado de plaquetas y el 5% de PFC para un crecimiento celular óptimo, pueden recogerse 200 ml de plaquetas después de la centrifugación en un volumen pequeño y resuspenderse en 200 ml de PFC. El suplemento producido de esta manera se puede agregar al medio basal a la concentración final del 5%.

Se observan los siguientes puntos con respecto a las cantidades de PFC y TK a las que se hace referencia en el presente documento. 1% de PFC en 1 l de Bio-1 corresponde a 8,0 -10,0 ml de plasma humano coagulativamente activo. Con respecto al lisado de plaquetas, la concentración final de plaquetas en el producto y el porcentaje en Bio-1 dependen del método de preparación de plaquetas utilizado. (1) TK de aféresis (Apceth): 1 ml de lisado de TK corresponde a $6,5 \times 10^8$ - $4,5 \times 10^9$ de plaquetas. Por consiguiente, 1 l de Bio-1 que tiene 1% de TK contiene una cantidad de lisado igual a 6.5×10^9 - 4.5×10^{10} de plaquetas. El porcentaje de lisado de plaquetas utilizado para Bio-1 debe calcularse en función de la cantidad de plaquetas en el material de partida y los valores de % vol establecidos en esta solicitud. (2) Lisado de plaquetas de sangre completa: hay 45 - 90 x 10^9 plaquetas en 50-60 ml de suspensión.

Referencias

- Blande, et al., "Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate", Transfusion, Vol. 49, Dic. 2009; 2680-2685.
- Capelli, et al. (2007) "Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts." Bone Marrow Transplant. 40(8):785-91.
- Horn et al. (2010). "Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells" Cytotherapy, 12: 888-898.
- Kocaoemer, et al., "Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue", Stem Cells, Nov. 11, 2008; 1271-1278.
- Langer and Gawaz, "Platelets in regenerative medicine", Basic Res Cardiol 103:299-307 (2008).
- Muller, et al. (2006). "Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM." Cytotherapy 8(5): 437-44.
- Salvadè, et al., "Characterization of Platelet Lysate Cultured Mesenchymal Stromal Cells and Their Potential Use in Tissue-Engineered Osteogenic Devices for the Treatment of Bone Defects." Tissue Eng Part C Methods. 15, 2009:185-196.
- Schallmoser, et al. (2008) "Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum." Tissue Eng Part C Methods. 14(3):185-96.
- Stellos and Gawaz, "Platelet interaction with progenitor cells: Potential implications for regenerative medicine", Thromb Haemost 2007; 98:922-929

REIVINDICACIONES

1. Un medio de crecimiento celular que comprende:
- 5 a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor que 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 2% al 15% del volumen total del medio de crecimiento celular;
 - b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% del volumen total del medio de crecimiento celular;
 - c) heparina a una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml del medio de crecimiento celular;
 - 10 d) L-glutamina a una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
 - e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células mamíferas, en el que el medio sin suero y bajo en glucosa constituye del 75% al 97% del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d); en el que el término PFC se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de
 - 15 las 6 horas de la recolección;
- en el que el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.
2. El medio de crecimiento celular de la reivindicación 1, en el que el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC
- 20 se corresponden con respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Rh.
3. Un suplemento de medio de crecimiento celular que comprende:
- a) lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye del 17% al 94% del volumen total del suplemento del medio de crecimiento celular; y
 - 25 b) filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 6% al 83% del volumen total del suplemento de medio de crecimiento celular; en el que el término PFC se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de las 6 horas de la recolección.
4. El suplemento de medio de crecimiento celular de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente heparina.
- 30 5. El suplemento de medio de crecimiento celular de la reivindicación 3 o 4, en el que el lisado de plaquetas y el filtrado de PFC se corresponden con respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y Rh.
6. Un kit adecuado para su uso en la expansión de células madre CD34-negativas humanas que comprende, en compartimentos separados:
- a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, y
 - 35 b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el término PFC se refiere a la porción fluida de sangre humana que se ha centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de las 6 horas de la recolección;
- Donde (i) el lisado constituye del 17% al 94% del volumen combinado de (a) y (b) y (ii) el filtrado PFC constituye del 6% al 83% del volumen combinado de (a) y (b).

7. El kit de la reivindicación 6 que comprende, en compartimentos separados,
- a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro,
 - b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, y
 - c) heparina.
- 5 Donde (i) el lisado constituye del 17% al 94% del volumen combinado de (a) - (c), y (ii) el filtrado PFC constituye del 6% al 83% del volumen combinado de (a) - (c).
8. Una composición de materia que comprende (a) células madre CD34-negativas humanas y (b) el medio de crecimiento celular de una de las reivindicaciones 1 o 2.
- 10 9. Un método para fabricar un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, que comprende los siguientes pasos:
- a) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;
 - b) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
 - c) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante una duración adecuada para sedimentar con materia sólida;
 - d) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (c) a una velocidad y durante un tiempo adecuados para sedimentar la materia sólida en su interior; y
 - e) filtrar el sobrenadante de la etapa (d) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .
- 15
- 20
10. Un método para preparar un plasma de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida de más de 0,22 μm de diámetro, que comprende los siguientes pasos:
- a) descongelar el PFC humano;
 - b) centrifugar del PFC descongelado a una velocidad y durante un tiempo adecuados para separar las partes líquidas y sólidas en esto; y
 - c) filtrar la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, en donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de 40 μm y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no más grande que 0,22 μm ;
- 25
- 30 en el que el PFC se obtiene de la porción fluida de sangre humana que ha sido centrifugado, separado y solidificado a -18 °C dentro de las 6 horas de la recolección.
11. Un método para fabricar un medio de crecimiento celular que comprende la etapa de combinar lo siguiente:
- a) un lisado de plaquetas humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el lisado constituye de 2% a 15% del volumen total del medio de crecimiento celular;
 - b) un filtrado de plasma fresco congelado (PFC) humano libre de materia sólida mayor de 0,22 μm de diámetro, en el que el filtrado de PFC constituye del 1% al 10% del volumen total del medio de crecimiento celular;
 - c) heparina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0 U/ml a 10 U/ml del medio de crecimiento celular;
 - d) L-glutamina en una cantidad suficiente para producir una concentración de 0,5 mM a 10 mM; y
- 35

ES 2 657 840 T3

- e) un medio sin suero, bajo en glucosa, adecuado para el crecimiento de células mamíferas, en el medio sin suero y bajo en glucosa constituye del 75% al 97% del volumen total del medio de crecimiento celular, y puede contener la L-glutamina de la parte (d);
- 5 en el que el PFC se obtiene de la porción fluida de sangre humana que ha sido centrifugada, separada y solidificada a -18 °C dentro de las 6 horas de la recolección;
- en el que el medio de crecimiento celular permite la expansión de células madre CD34-negativas humanas y en el que las células madre CD34-negativas expandidas resultantes retienen la capacidad de diferenciarse.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el lisado de plaquetas de la parte (a) se prepara de acuerdo con los siguientes pasos:
- 10 (i) congelar concentrado de plaquetas humanas, lisando así las plaquetas en el mismo;
- (ii) descongelar las plaquetas lisadas resultantes;
- (iii) centrifugar las plaquetas lisadas descongeladas a una velocidad y durante un tiempo adecuado para sedimentar con materia sólida;
- 15 (iv) volver a centrifugar el sobrenadante de la etapa (iii) a una velocidad y durante un tiempo adecuados para sedimentar la materia sólida en su interior; y
- (v) filtrar el sobrenadante del paso (iv) al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, en donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de al menos 0,8 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .
- 20 13. El método de la reivindicación 12, en el que el concentrado de plaquetas humanas de la etapa (i) se prepara por centrifugación de plaquetas y por lo tanto granulación de las mismas; separado de las plaquetas peletizadas de la fase líquida; y reconstitución de las plaquetas resultantes en PFC.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el filtrado de PFC de la parte (b) se prepara por: descongelación de PFC humano; centrifugación del PFC; descongelación resultante a una
- 25 velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo; y filtrado de la porción líquida resultante al menos dos veces usando filtros de tamaño de poro decreciente, donde la primera filtración se realiza usando un filtro que tiene poros de al menos 40 μm , y la última filtración se realiza usando un filtro que tiene poros no mayores de 0,22 μm .
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el filtrado de PFC de la parte (b) se prepara por: (i) descongelación de PFC humano; (ii) congelación del PFC humano descongelado; (iii)
- 30 descongelación del PFC humano resultante; y (iv) centrifugación del PFC descongelado resultante a una velocidad y durante una duración adecuada para separar las porciones líquida y sólida del mismo, preferiblemente en el que el PFC descongelado del paso (iii) se congela y descongela al menos una vez antes del paso de centrifugación (iv).
- 35 16. Un método para expandir una población de células madre CD34-negativas humanas que comprende la etapa de incubar las células madre a una temperatura adecuada en el medio de una de las reivindicaciones 1 o 2.

Figura 1

Tiempo de duplicación de MSC en medios de diferentes composiciones

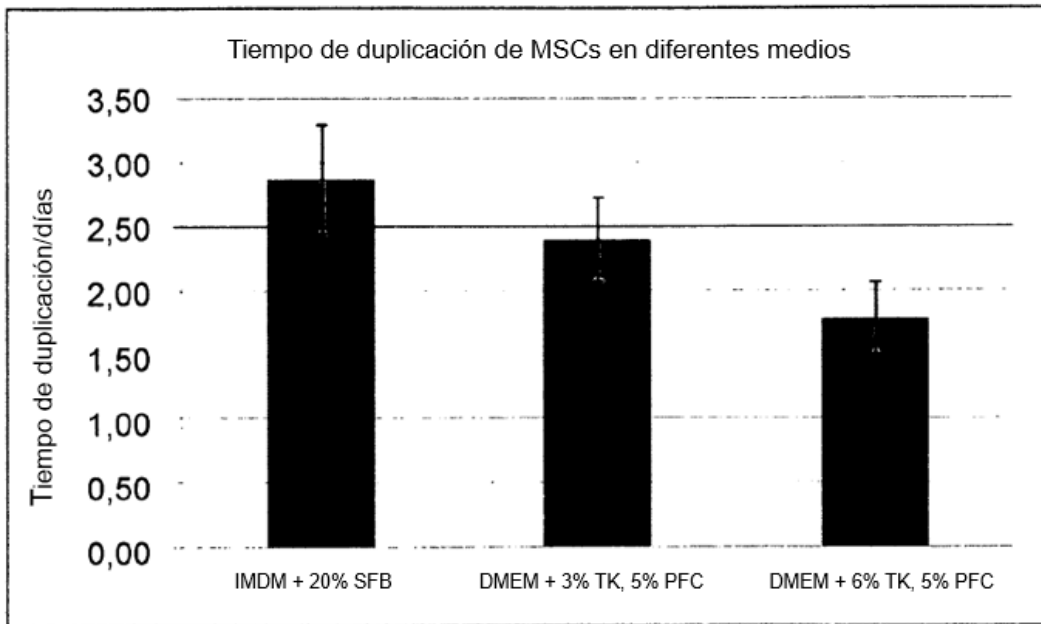


Figura 2

Tasa de proliferación de MSC en diferentes medios

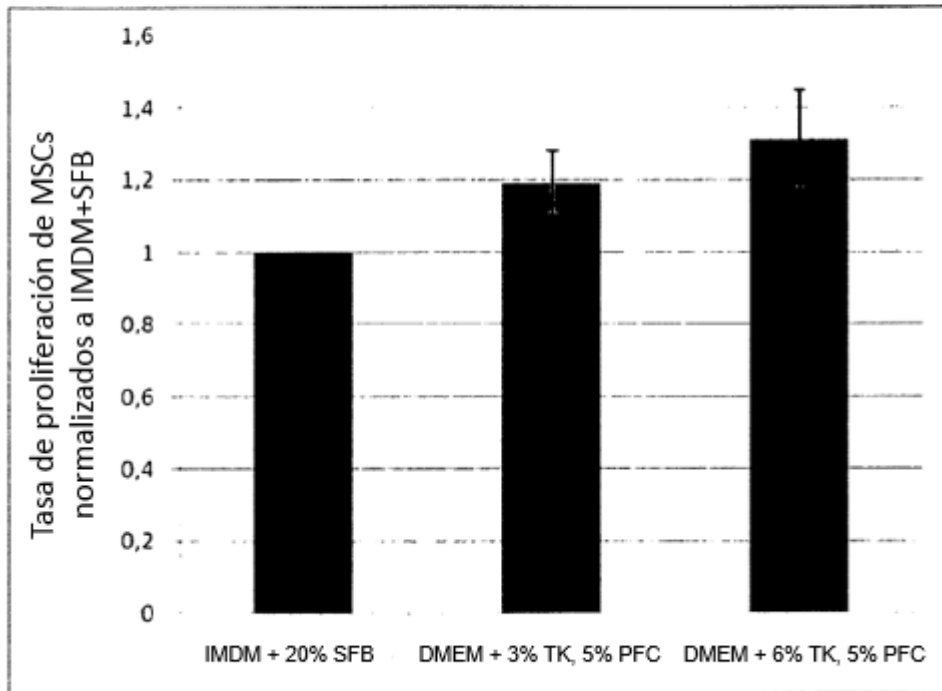


Figura 3

Dinámica del crecimiento de MSC en Bio-1

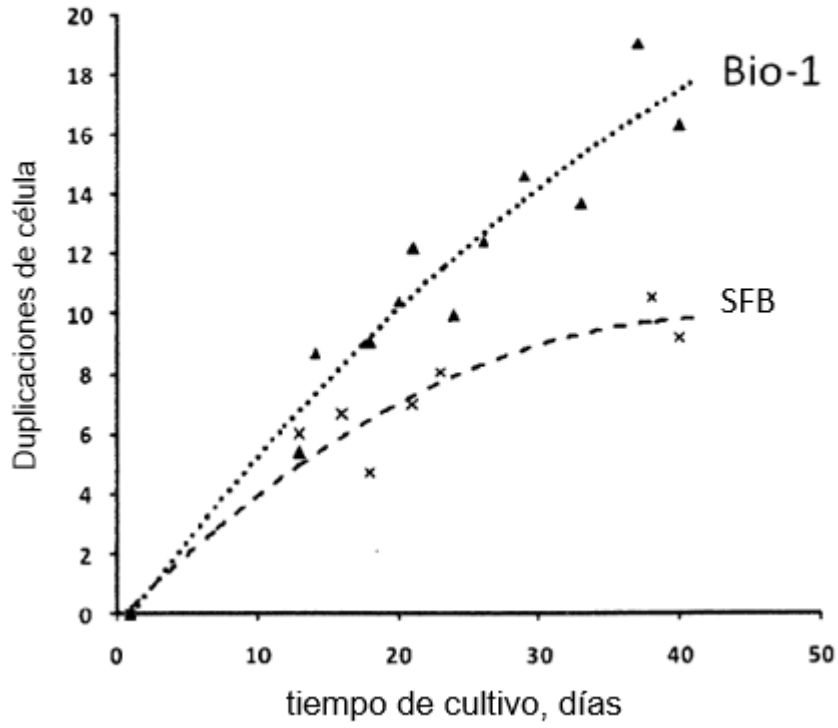


Figura 4

Expresión de proteínas superficiales específicas de MSC

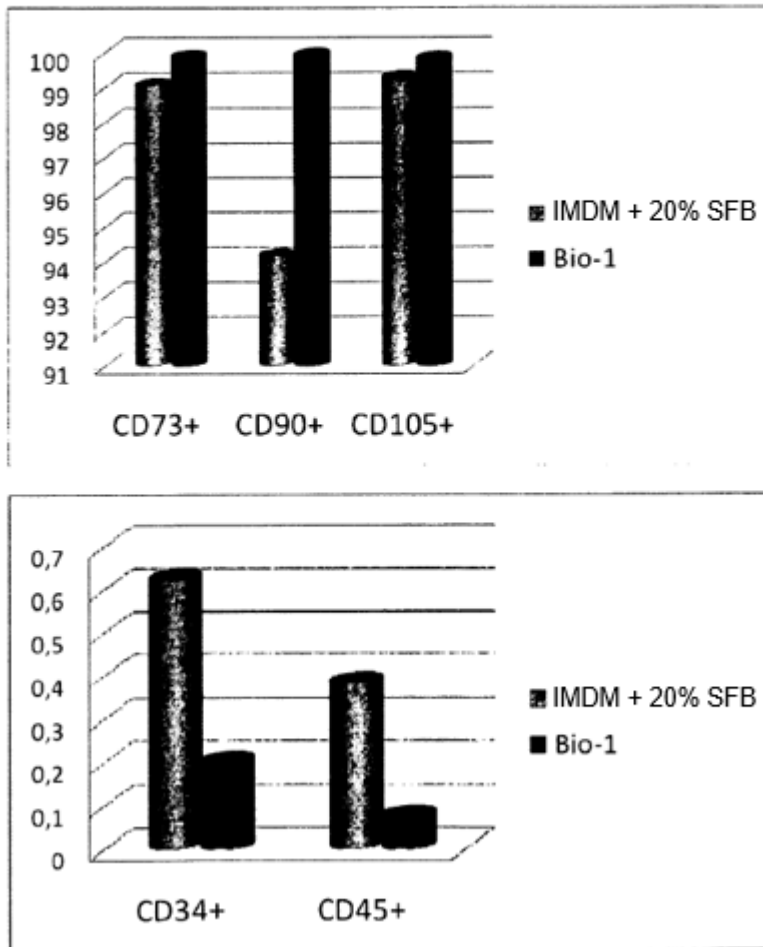


Figura 5

Análisis de la población MSC mediante citometría de flujo

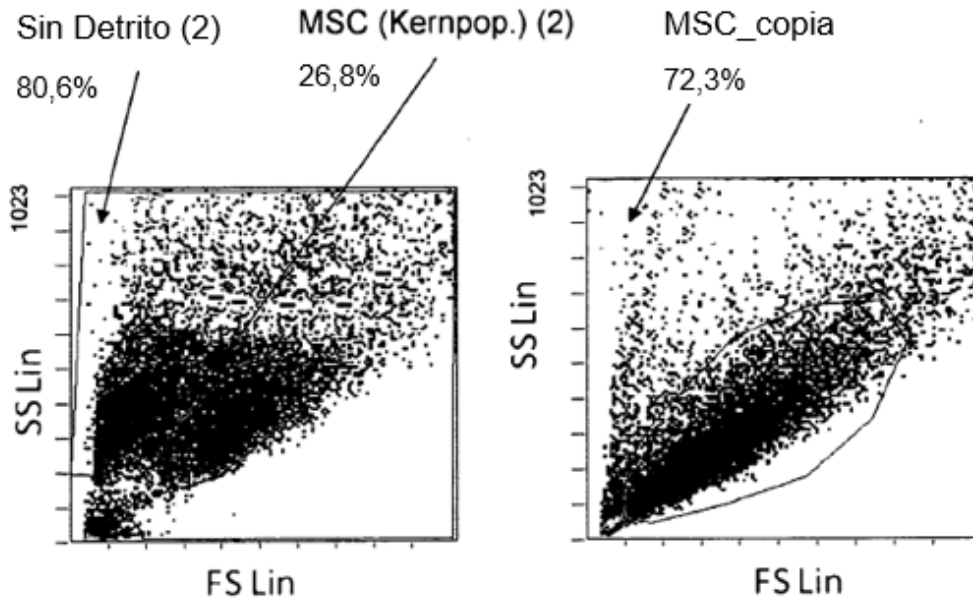


Figura 6

Inducción de diferenciación del crecimiento de MSCs en Bio-1

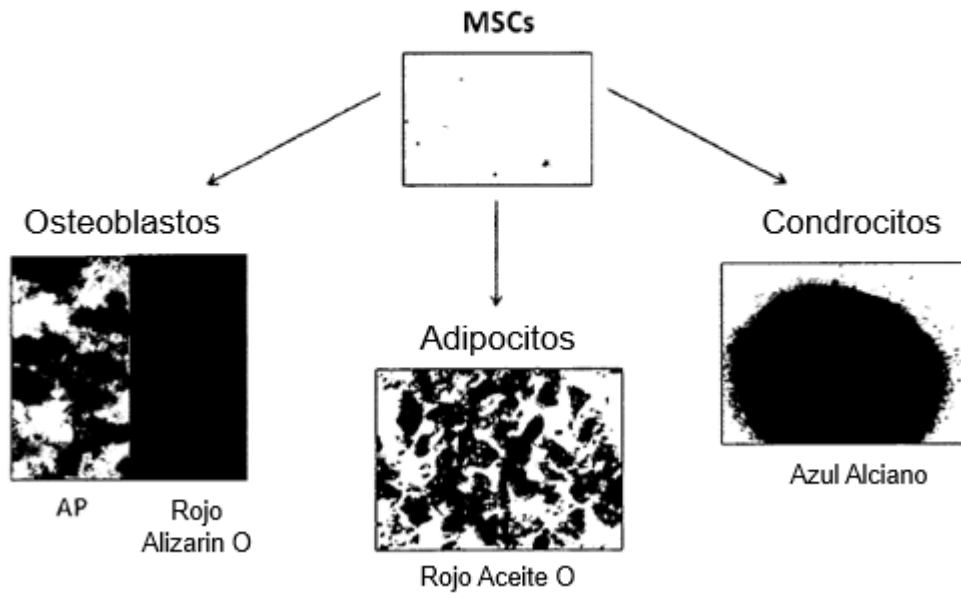


Figura 7

Tiempo de duplicación (días) de MSCs

Muestra	1	2	3	4	5	6
	TK +PFC 4000g	TK +PFC 4000g + 100µm	TK +PFC 100µm	TK +PFC 40µm	TK +PFC 40µm + 0,22µm	TK +PFC 40µm + 0,4µm
P1	2,32	2,35	2,15	1,55	1,58	1,52
P2				1,6	1,52	1,56

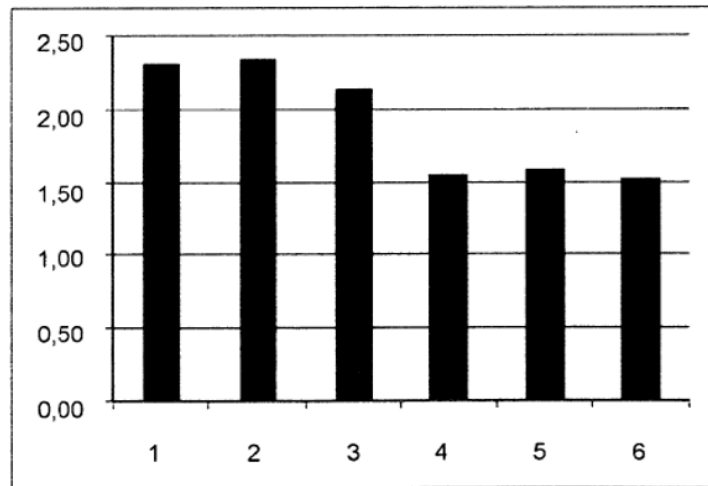


Figura 8

Cantidad de Duplicaciones conseguidas después de 20 días

Muestra	1	2	3	4	5	6
	TK +PFC 4000g	TK +PFC 4000g + 100µm	TK +PFC 100µm	TK +PFC 40µm	TK +PFC 40µm + 0,22 µm	TK +PFC 40µm + 0,4µm
	5,17	4,25	5,58	7,59	7,79	7,76

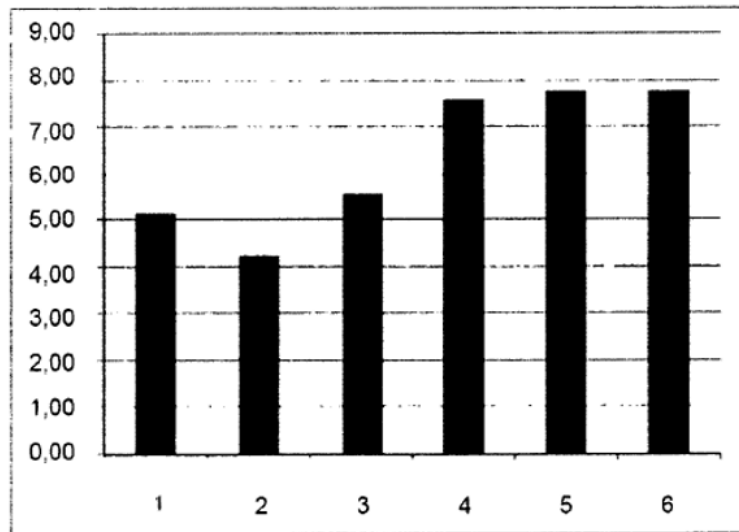


Figura 9

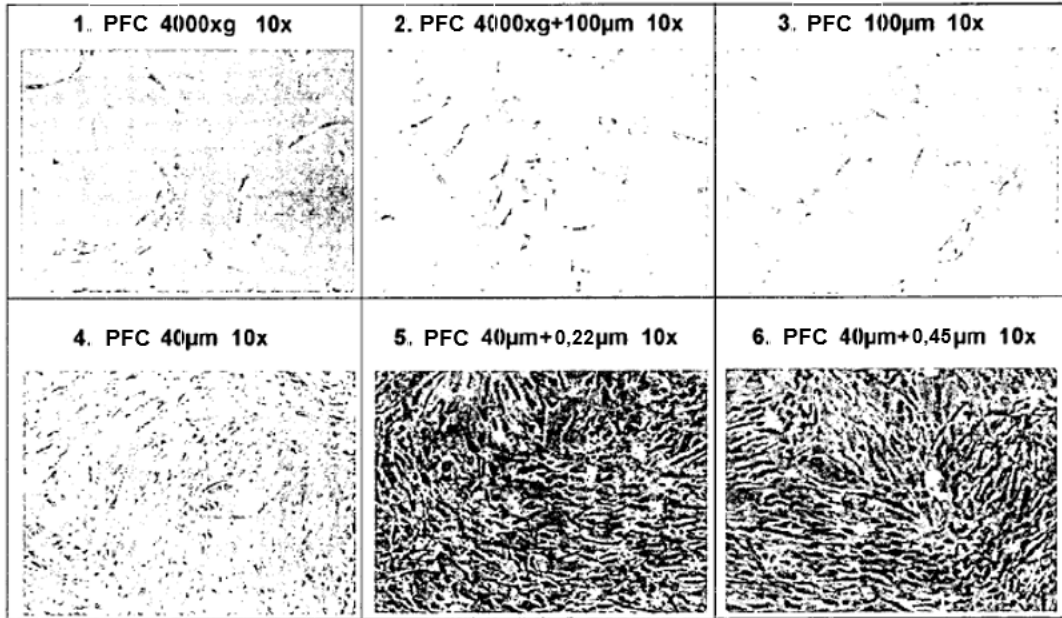


Figura 10

Tiempo de Duplicación (días) de MSCs

TK + PFC 4000xg	TK + PFC 40µm	TK + PFC 40µm, 0,45µm	TK + PFC 4000xg, 40µm, 0,45µm	TK 0,45µm + PFC 4000xg	TK 0,45µm + PFC 4000µm	TK 0,45µm + PFC 40µm, 0,45µm	TK 0,45µm + PFC 4000xg, 40µm, 0,45µm
8,12		9,28	10,32	4,03	4,64	3,98	3,63

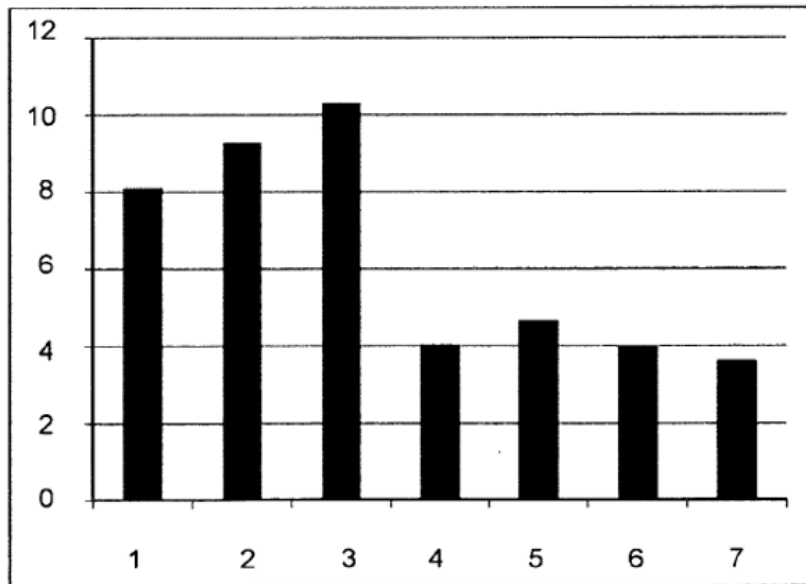


Figura 11

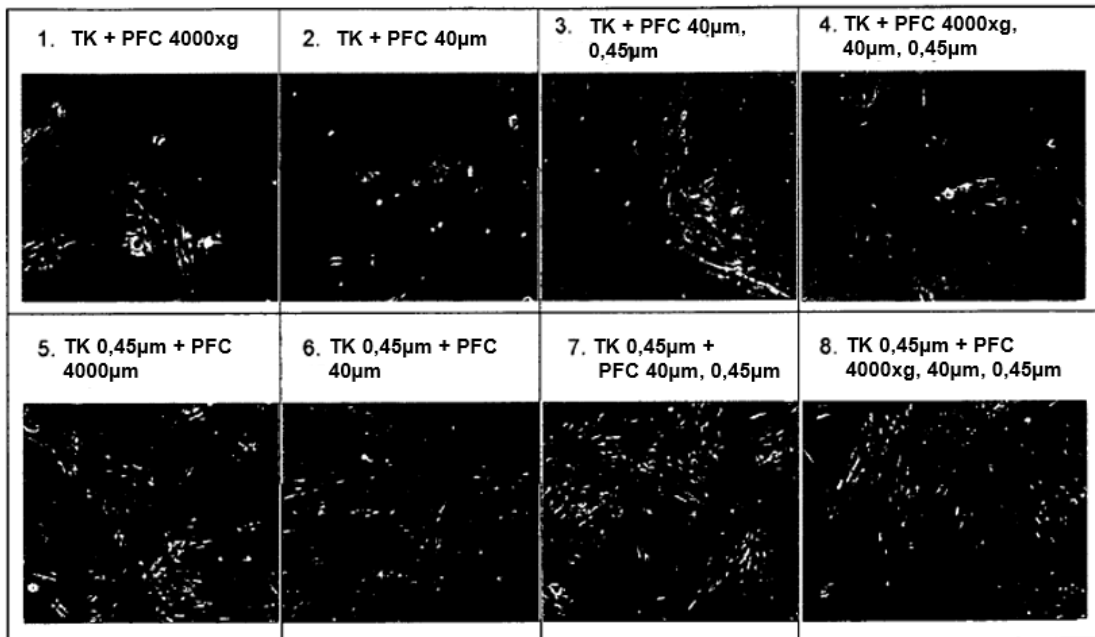


Figura 12

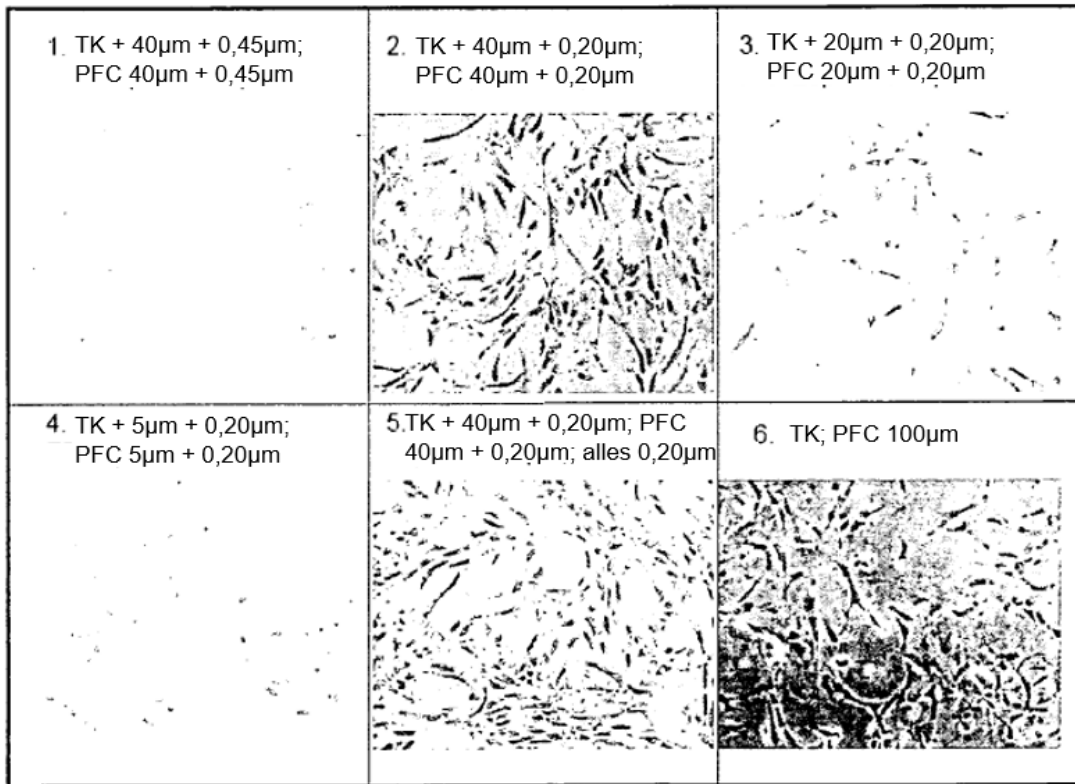


Figura 13

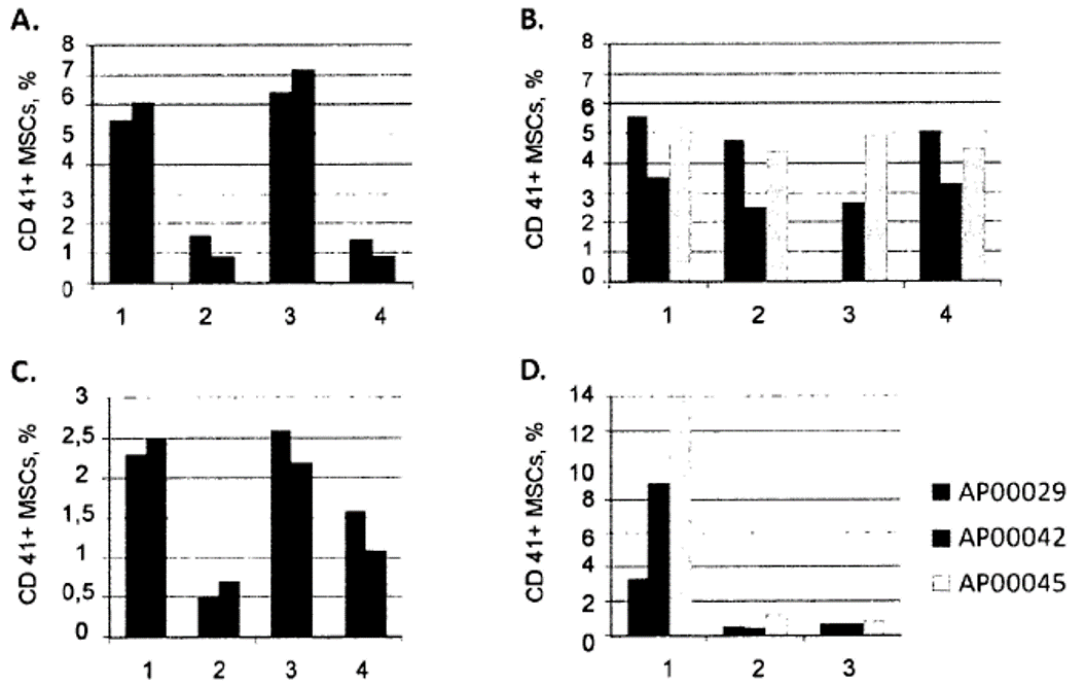


Figura 14

