

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 551**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12M 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 16170752 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3095856**

54 Título: **Composiciones que tienen contenidos plaquetarios**

30 Prioridad:

16.09.2008 US 97490 P

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

05.06.2020

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**DIETZ, ALLAN B.;
BUTLER, GREG W. y
GUSTAFSON, MICHAEL P.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 755 551 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

Composiciones que tienen contenidos plaquetarios

Antecedentes

1. Campo técnico

5 Este documento se refiere a métodos y materiales implicados en la fabricación y el uso de factores de crecimiento, quimiocinas y moléculas responsables de crecimiento, diferenciación, o mantenimiento de células sin diferencias a partir de plaquetas humanas normales (por ejemplo, lisados plaquetarios). Por ejemplo, este documento se refiere a métodos y materiales para la fabricación de plaquetas o preparaciones plaquetarias (por ejemplo, preparaciones plaquetarias de aféresis) los factores utilizados para cultivar células madre rápidamente (por ejemplo, células madre adultas), para su mantenimiento en una forma sin diferencias, como un aditivo a medios para diferenciar las células madre (por ejemplo, células madre adultas) en combinación con otros factores, para desarrollar cultivos de células primarias (por ejemplo, células tumorales y líneas de células tumorales), y para desarrollar células tumorales con propiedades de células madre. Este documento también se refiere a métodos y materiales que se pueden utilizar para identificar, aislar, enriquecer, u optimizar combinaciones de factores de crecimiento eficaces utilizando plaquetas como material de partida. Además, el documento se refiere a suplementos de cultivo de plasma de plaquetas y composiciones que tienen contenidos plaquetarios.

2. Información de antecedentes

20 El cultivo celular está implicado en gran parte de la biología moderna, descubrimiento de fármacos y terapia. Por ejemplo, las células tumorales primarias pueden ser cultivadas para obtener una fuente de antígenos que se puede utilizar en las vacunas anti-tumorales. Dos métodos generales se utilizan para cultivar células tumorales del cerebro primario. Tradicionalmente, las células se cultivan en medio mínimo suplementado con suero fetal bovino. Las células cultivadas de esta manera pueden exhibir aplicabilidad limitada como una fuente de antígeno eficaces, ya que a menudo presentan características de los subtipos de células gliales diferenciadas con una capacidad reducida para recapitular el tumor original in vivo. Alternativamente, las células pueden ser cultivadas en un medio enriquecido suplementado con factores de crecimiento, EGF y FGF. Las células cultivadas en este medio pueden formar neuroesferas y pueden contener poblaciones de células madre tumorales, que recapitulan más de cerca las características fenotípicas del tumor primario. Aunque estas células pueden tener las capacidades proliferativas reducidas, por lo general son menos diferenciadas, más tumorigénicas y más antigénico que las células cultivadas en suero fetal bovino (Lee et al., Cancer Cell., 9:391-403 (2006)). Estos enfoques no aparecen generar cultivos de tumor primario con altas eficiencias y no aparecen permitir el crecimiento de cultivos lo suficientemente rápido para muchas aplicaciones. Si bien estos métodos pueden ser usados para generar cultivos de células a partir de gliomas malignos, estos protocolos incluyen por lo general materiales y métodos no apropiados para el uso clínico.

Resumen

35 Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con la obtención y utilización de moléculas y factores de crecimiento encontrados en las plaquetas (por ejemplo, lisados plaquetarios o "PL") o medios que contienen las plaquetas (por ejemplo, un sobrenadante o filtrado a partir de una preparación plaquetaria tales como una preparación plaquetaria de aféresis). Por ejemplo, este documento se refiere a métodos y materiales para la fabricación y uso de composiciones que tienen contenidos plaquetarios (por ejemplo, lisados y/o sobrenadantes plaquetarios o filtrados de medios que contienen plaquetas). Las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento pueden ser utilizadas para promover un mayor crecimiento de las células (por ejemplo, células progenitoras adultas normales, células madre, y células precursoras). Ejemplos de tales células incluyen, sin limitación, células mesenquimales del estroma, células precursoras endoteliales, fibroblastos y células epiteliales. Las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento también se pueden utilizar para mejorar la diferenciación de las células progenitoras, células madre, y células precursoras en subtipos funcionales de manera eficiente. Además, las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento pueden ser utilizados para promover un mayor crecimiento de las células madre no diferenciadas tales células madre del tipo tumoral y las células estromales mesenquimales adultas o para mantener las células como una mezcla de células madre y células diferenciadas, tales como la encontrada en cultivos de tumores primarios y líneas de células tumorales. En algunos casos, las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento se pueden utilizar para generar de manera eficiente cultivos de células primarias (por ejemplo, líneas de células tumorales). Como se describe en este documento, las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento (por ejemplo, lisados plaquetarios, sobrenadantes a partir de medios que contienen plaquetas, y filtrados de medios que contienen plaquetas) se pueden utilizar para obtener la cinética de crecimiento superiores cuando el cultivo celular (por ejemplo, células progenitoras y células madre del tipo tumoral) en comparación con los cultivos utilizando la administración de suplementos de suero humano, suero fetal bovino, o medio libre de suero con administración de suplementos del factor de crecimiento recombinante. Las composiciones que tienen contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento también se pueden fabricar de una manera que sea aceptable para uso clínico (por ejemplo, cumple con las regulaciones actuales de buenas prácticas de fabricación).

Este documento también proporciona suplementos de cultivo de plaquetas en plasma y métodos de cultivo celular y materiales para el uso de suplementos de cultivo de plasma de plaquetas. El término "suplemento de cultivo de plasma de plaquetas" como se utiliza en este documento, se refiere a una composición que contiene (a) plasma (por ejemplo, plasma humano) y (b) contenido plaquetario que está en la forma de un lisado plaquetario que contenía más de 3×10^8 plaquetas por mL (por ejemplo, más de 4×10^8 plaquetas por mL, más de 5×10^8 plaquetas por mL, más de 6×10^8 plaquetas por mL, más de 7×10^8 plaquetas por mL, más de 8×10^8 plaquetas por mL, más de 9×10^8 plaquetas por mL, o más de 1×10^9 plaquetas por mL) antes de lisis o un medio que contenía más de 3×10^8 plaquetas por mL (por ejemplo, más de 4×10^8 plaquetas por mL, más de 5×10^8 plaquetas por mL, más de 6×10^8 plaquetas por mL, más de 7×10^8 plaquetas por mL, más de 8×10^8 plaquetas por mL, más de 9×10^8 plaquetas por mL, o más de 1×10^9 plaquetas por mL) antes de que se eliminen las plaquetas. Dicho medio puede ser un sobrenadante o filtrado obtenido a partir de una preparación plaquetaria tal como una preparación plaquetaria de aféresis o una preparación plaquetaria de aislamiento a gran escala. En algunos casos, tales sobrenadantes filtrados o se pueden obtener de las preparaciones plaquetarias vencidas (por ejemplo, preparaciones plaquetarias de aféresis vencidas). Las preparaciones plaquetarias que han sido superados pueden ser preparaciones plaquetarias (por ejemplo, las preparaciones plaquetarias de aféresis) que se han obtenido de un ser humano vivo y almacenados entre 20°C y 24°C , durante más de cuatro días (por ejemplo, más de cinco, más de seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 15 o más días). Normalmente, se toman 1-2 litros de sangre que tiene un recuento de plaquetas de $150,000/\text{mm}^3$ para producir una unidad de plaquetas que tienen aproximadamente 3×10^{11} plaquetas. Cualquier volumen de una preparación que contiene las plaquetas en las concentraciones anteriores se puede utilizar. Por ejemplo, 30 mL (por ejemplo, dos tubos de 15 mL) 50 mL, 100 mL, 500 mL, o una unidad completa de las plaquetas se puede utilizar para obtener un lisado plaquetario o un medio (por ejemplo, plasma) que contenía más de 3×10^8 plaquetas por mL.

Un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas proporcionado en este documento puede tener la capacidad de establecer cultivos de glioma. Por ejemplo, medio esencial mínimo con 5 por ciento de un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas proporcionado en este documento puede ser capaz de establecer, a partir de tejido de la biopsia de glioblastoma humano multiforme recién diagnosticado, cultivos de glioma humano que tienen más de 3×10^7 células dentro de 60 días a 37°C (en un incubador humidificado con 5% de CO_2) con una tasa de éxito que es más de 30 por ciento (por ejemplo, más de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, o más por ciento). Esta tasa de éxito se basa en el número de diferentes muestras de tejido de biopsia multiforme de glioblastoma humano recién diagnosticados (es decir, muestras para los diferentes seres humanos) que se pueden utilizar para establecer un cultivo de glioma, en comparación con el número de intentos utilizando una sola muestra de tejido de biopsia multiforme de glioblastoma de humano varias veces.

Los métodos y materiales proporcionados en este documento se pueden utilizar para desarrollar células madre adultas rápidamente, para diferenciar células madre (por ejemplo, células madre adultas), para desarrollar cultivos de células primarias (por ejemplo, líneas de células de tumor), para desarrollar células madre del tipo tumoral, e identificar los factores de crecimiento efectivos. Por ejemplo, los métodos y materiales proporcionados en este documento pueden permitir a los médicos o el personal médico desarrollar vacunas contra el cáncer autólogas específicas del paciente, mientras que se siguen las directrices de la FDA. Las células tumorales tales como las células de glioma maligno cultivadas utilizando los métodos y los materiales proporcionados en este documento puede mantener muchos aspectos de fenotipos de células madre tumorales neural y puede ser enriquecido en antígenos específicos de tumores deseados para el reconocimiento de las respuestas inmunes del huésped. La cinética de crecimiento de las células cultivadas utilizando los métodos y materiales proporcionados en este documento pueden permitir a los médicos para fabricar suficiente material celular para múltiples vacunas en un corto período de tiempo dictado por los regímenes terapéuticos estándares actuales. Por lo tanto, los métodos y materiales proporcionados en este documento pueden proporcionar opciones adicionales para la expansión y el uso de material tumoral específico del paciente para la terapia celular.

Otra importancia del cultivo celular es el creciente uso de células como fármacos. En particular, células madre (tanto de adultos como fetales) se pueden utilizar en medicina regenerativa. En tales casos, la velocidad del crecimiento celular, la fidelidad de la genética de cultivo, y la aplicabilidad clínica puede estar involucrada en el éxito de las terapias basadas en células.

En general, un aspecto de este documento presenta una composición de lisado plaquetario que comprende, o consiste esencialmente en, un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. La preparación plaquetaria lisada puede ser una preparación plaquetaria de aféresis lisada. El filtro puede ser un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. El filtro puede ser un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. El filtrado puede ser de la preparación plaquetaria lisada que se pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. La preparación plaquetaria lisada puede comprender sobrenadante de la centrifugación de las plaquetas lisadas. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas a través de al menos dos ciclos de congelación/descongelación. La centrifugación puede comprender una fuerza entre $2000 \times g$ y $4000 \times g$ durante entre 15 y 45 minutos. La centrifugación puede comprender una fuerza de aproximadamente $3000 \times g$ durante aproximadamente 30 minutos. La composición de lisado plaquetario puede comprender más de 200 pg de polipéptido VEGF por mL. El cultivo de 1.4×10^6 células madre mesenquimales con un medio que contiene aproximadamente cinco por ciento de la composición de lisado plaquetario puede resultar en

más de 1.4×10^7 células después de tres días. Las células madre mesenquimales pueden ser células derivadas de tejido adiposo.

5 En otro aspecto, este documento presenta una composición de lisado plaquetario producido mediante la filtración de una preparación plaquetaria lisada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. La preparación plaquetaria lisada puede ser una preparación plaquetaria de aféresis lisadas. El filtro puede ser un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. El filtro puede ser un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. La composición de lisado plaquetario puede ser producida mediante la filtración de la preparación plaquetaria lisada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. La preparación plaquetaria lisada puede comprender sobrenadante de la centrifugación de plaquetas lisadas. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas a través de al menos dos ciclos de congelación/descongelación. La centrifugación puede comprender una fuerza entre $2000 \times g$ y $4000 \times g$ durante entre 15 y 45 minutos. La centrifugación puede comprender una fuerza de aproximadamente $3000 \times g$, durante aproximadamente 30 minutos.

15 En otro aspecto, este documento presenta un método para la fabricación de una composición de lisado plaquetario. El método comprende, o consiste esencialmente en, filtración de una preparación plaquetaria lisada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. La preparación plaquetaria lisada puede ser una preparación plaquetaria de aféresis lisadas. El filtro puede ser un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. El filtro puede ser un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. El método puede comprender la filtración de la preparación plaquetaria lisada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. La preparación plaquetaria lisada puede comprender sobrenadante de la centrifugación de las plaquetas lisadas. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación. Las plaquetas lisadas pueden ser plaquetas lisadas a través de al menos dos ciclos de congelación/descongelación. La centrifugación puede comprender una fuerza entre $2000 \times g$ y $4000 \times g$ durante entre 15 y 45 minutos. La centrifugación puede comprender una fuerza de aproximadamente $3000 \times g$ durante aproximadamente 30 minutos.

25 En otro aspecto, este documento presenta un método para la fabricación de una composición de lisado plaquetario. El método comprende, o consiste esencialmente en: (a) lisado de plaquetas a través de uno o más ciclos de congelación/descongelación para obtener plaquetas lisadas, (b) centrifugación de las plaquetas lisadas para obtener un sobrenadante, y (c) filtrar el sobrenadante a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos para obtener un filtrado, en donde el filtrado es la composición lisado plaquetario. La etapa de lisis puede comprender al menos dos ciclos de congelación/descongelación. La etapa de centrifugación puede comprender el uso de una fuerza entre $2000 \times g$ y $4000 \times g$ durante entre 15 y 45 minutos. La etapa de centrifugación puede comprender una fuerza de aproximadamente $3000 \times g$ durante aproximadamente 30 minutos. El filtro puede ser un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. El filtro puede ser un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. La etapa de filtración puede comprender filtrar el sobrenadante a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$. Las plaquetas pueden ser plaquetas de aféresis.

35 En otro aspecto, este documento presenta un método para la expansión de una población de células que comprende, o consiste esencialmente en, cultivo de una primera población de células en presencia de medio que comprende una composición de lisado plaquetario bajo condiciones en donde la primera población de células se expande a una segunda población de células que tienen más células que la primera población, en donde la composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. Las células pueden ser células madre adultas, células de tumor primario, o células madre tumorales.

40 En otro aspecto, este documento presenta un método para la diferenciación de células madre. El método comprende, o consiste esencialmente en, cultivo de las células madre en presencia de medio de diferenciación que comprende una composición de lisado plaquetario bajo condiciones en donde las células madre se diferencian, en donde la composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos.

45 En otro aspecto, este documento presenta un método para la curación de una herida. El método comprende, o consiste esencialmente en, poner en contacto la herida con una composición de lisado plaquetario, en donde la composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. La herida puede ser un corte, fístula o úlcera diabética. La etapa de contacto puede comprender el uso de una puntada o adhesivo que comprende la composición lisado plaquetario en contacto con la herida. La etapa de contacto puede comprender la pulverización de la composición de lisado plaquetario sobre la herida.

En otro aspecto, este documento presenta una composición que contiene el contenido de plasma y plaquetas a partir de una preparación plaquetaria pasada a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o menos. El plasma puede ser plasma humano. El contenido plaquetario puede ser contenido plaquetario humano.

55 En otro aspecto, este documento presenta un medio de composición que comprende (por ejemplo, un medio esencial mínimo) y un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas. El suplemento de cultivo de plasma de plaquetas puede ser un lisado plaquetario que comprende plasma. El suplemento de cultivo de plasma de plaquetas puede ser un filtrado obtenido mediante filtración una preparación plaquetaria de aféresis que comprende plasma. La

preparación plaquetaria de aféresis puede ser una preparación plaquetaria de aféresis recolectada de un ser humano de más de tres días antes. La preparación plaquetaria de aféresis puede ser una preparación plaquetaria de aféresis recolectada de un ser humano de más de cinco días antes. La preparación plaquetaria de aféresis puede ser una preparación plaquetaria de aféresis recolectada de un ser humano de más de seis días antes. El suplemento de cultivo de plasma de plaquetas puede ser un sobrenadante obtenido a partir de girar una preparación plaquetaria de aféresis que comprende plasma. La preparación plaquetaria de aféresis puede ser una preparación plaquetaria de aféresis recolectada de un ser humano de más de diez días antes.

En otro aspecto, este documento presenta un método para la obtención de un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas que comprende la eliminación de plaquetas o residuos de plaquetas de una preparación plaquetaria de aféresis de tal manera que al menos algunos del plasma dentro de la preparación plaquetaria de aféresis se retiene, obteniendo de esta manera el suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde el suplemento de cultivo de plasma de plaquetas comprende la capacidad de inducir la diferenciación de células madre adultas 1×10^6 en al menos 1×10^3 células progenitoras de cardiomiocitos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos, miocitos, o células nerviosas dentro de los 60 días cuando se añade a medio a una concentración de 5 por ciento, como medios de base con la administración de suplementos dirigida al tipo de célula deseado.

En otro aspecto, este documento presenta de un cultivo celular aislado que comprende células MCGBM103 cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas.

En otro aspecto, este documento presenta de un cultivo celular aislado que comprende células MCGBM106 cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas.

En otro aspecto, este documento presenta un cultivo celular aislado que comprende células cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde las células crecen en el medio a una velocidad que es más rápida que la velocidad de células control cultivadas en medio de control que comprende 10 por ciento de suero fetal bovino. Las células y las células de control pueden ser células del tumor primario. Las células y las células de control pueden ser células de glioma humanas primarias. Las células y las células de control pueden ser células madre. Las células y las células de control pueden ser células de fibroblastos. El medio y el medio de control pueden ser medio neurobasal o medio DMEM/F12. 1×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 1×10^6 de las células más rápido que 1×10^5 de las células control cultivadas en el medio de control crecen a 1×10^6 de las células control. 1×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 3×10^7 de las células más rápido que 1×10^5 de las células control cultivadas en el medio de control crecen a 3×10^7 de las células control. Las células pueden ser células de glioma primarias y 5×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 1×10^7 de las células dentro de los 30 días. Las células pueden ser células de glioma primarias y 5×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 1×10^7 de las células dentro de los 60 días. Las células pueden ser células madre, y 1×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 1×10^7 de las células dentro de los 14 días. Las células pueden ser células madre, y 1×10^5 de las células pueden crecer en el medio a más de 1×10^7 de las células dentro de los 20 días. Las células madre pueden ser células madre mesenquimales. Las células madre pueden ser, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Las células pueden crecer en el medio a una tasa que es 1.5 veces más rápido que la velocidad de las células de control cultivadas en el medio de control.

En otro aspecto, este documento presenta un cultivo celular aislado que comprende células tumorales cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde las células crecen en el medio de una manera que es genéticamente más estables que cuando las células de control se cultivan en el medio de control comprendiendo 10 por ciento de suero fetal bovino. Las células tumorales y las células de control pueden ser células del tumor primario. Las células tumorales y las células de control pueden ser células de glioma humanas primarias. El medio y el medio de control pueden ser medio neurobasal o medio DMEM/F12. Las células tumorales cultivadas en el medio para cuatro duplicaciones pueden exhibir menos que un cambio de cinco por ciento en cariotipo en comparación a las células tumorales cultivadas en el medio para una duplicación. Las células tumorales cultivadas en el medio para cuatro duplicaciones pueden exhibir menos que un cambio de tres por ciento en cariotipo en comparación a las células tumorales cultivadas en el medio para una duplicación. Las células tumorales cultivadas en el medio durante diez duplicaciones pueden exhibir menos que un cambio de cinco por ciento en cariotipo en comparación a las células tumorales cultivadas en el medio para una duplicación.

En otro aspecto, este documento presenta un cultivo celular aislado que comprende células madre cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde las células madre crecen en el medio de una manera que es genéticamente más estables que cuando las células madre de control se cultivan en medio de control que comprende 10 por ciento de suero fetal bovino. Las células madre y las células madre de control pueden ser células madre mesenquimales. Las células madre y las células madre de control pueden ser, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. El medio y el medio de control pueden ser medio neurobasal o medio DMEM/F12. Las células madre cultivadas en el medio para cuatro duplicaciones pueden exhibir menos que un cambio de cinco por ciento en cariotipo en comparación con las células madre cultivadas en el medio para una duplicación. Las células madre cultivadas en el medio para cuatro duplicaciones pueden exhibir menos que un cambio tres por ciento en cariotipo en comparación con las células madre cultivadas en el medio para una duplicación. Las células madre cultivadas en el medio durante diez duplicaciones pueden exhibir menos que un

cambio de cinco por ciento en cariotipo en comparación con las células madre cultivadas en el medio para una duplicación.

5 En otro aspecto, este documento presenta un método para la obtención de un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas. El método comprende, o consiste esencialmente en, eliminación de plaquetas o residuos de plaquetas de una preparación plaquetaria de aféresis de tal manera que al menos algunos del plasma dentro de la preparación plaquetaria de aféresis se retiene, obteniendo con ello el suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde el suplemento de cultivo de plasma de plaquetas comprende la capacidad de inducir la proliferación de menos de 1×10^6 , células madre mesenquimales, derivadas de tejido adiposo en el paso cinco en al menos 1×10^8 células dentro de 20 días cuando se añade a un medio esencial mínimo a una concentración de 5 por ciento. El suplemento de cultivo de plasma de plaquetas puede comprender la capacidad de inducir la proliferación de menos de 1×10^6 , células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el paso cinco en al menos 1×10^8 células dentro de los 15 días cuando se añade a un medio esencial mínimo a una concentración de 5 por ciento.

15 En otro aspecto, este documento presenta un método para la obtención de un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas. El método comprende, o consiste esencialmente en, la eliminación de plaquetas o los residuos de plaquetas de una preparación plaquetaria de aféresis de tal manera que al menos algunos de los plasma dentro de la preparación plaquetaria de aféresis se retiene, obteniendo de este modo el suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en medio esencial mínimo con 5 por ciento del suplemento de cultivo de plasma de plaquetas es capaz de establecer, a partir de tejido de la biopsia multiforme glioblastoma humano recién diagnosticado, los cultivos de glioma humano que tienen más de 3×10^7 células dentro de 60 días a 37°C con una tasa de éxito que es más de 30 por ciento. La tasa de éxito, puede ser más de 40 por ciento.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en el arte al que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar para practicar la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

25 En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, controlarán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

30 Descripción de los dibujos

La figura 1. Neuroesferas primarias autólogas exhibieron cinética de crecimiento mejorada y características de las células madre tumorales. A. Morfología de una escisión del tumor GBM y cultivada de forma independiente medio de células madre neurales (NSC) (neuroesferas), HCTL # 3 (principalmente células adherentes en este cultivo celular particular; cultivada utilizando 5% de lisado plaquetario) y DMEM + 10% de FBS (monocapa que forma células adherentes). Microfotografías de fase de luz, 10X. B. Cinética de crecimiento de los tumores GBM cultivada utilizando los tres métodos diferentes. C. Una tabla con la lista de resultados de la tinción de células madre neurales y otros marcadores de la superficie celular. Las células se cultivaron en cubreobjetos, y la expresión de nestina y SOX2 se analizó mediante inmunofluorescencia indirecta. Todos los otros marcadores fueron medidos por tinción de las células para cada uno y analizarlos utilizando citometría de flujo. +++ Indica >90% de células positivas, ++ >50%, + >10%, y - indica <1% de células positivas. D. Análisis citogenético de GBM083007 cultivado en tres cultivos diferentes. 20 células en metafase se contaron en cada análisis.

45 La figura 2. Identificación y seguimiento de antígenos asociados a tumores en cultivos tumorales cerebrales primarios autólogos. Se utilizó el análisis de chips de genes para determinar la expresión relativa del antígeno en tumores primarios (barras negras), cultivos de células madre tumorales obtenidos utilizando el protocolo Fine (Lee et al., Cancer Cell., 9:391-403 (2006)) (barras abiertas; también conocido como medio NSC, medio basal neural, medio de células madre neurales), y cultivos de tumores cerebrales utilizando HCTL#1 (barras rellenas; cultivado utilizando lisado plaquetario, y medio base fue DMEM/F12).

La figura 3 es un gráfico que representa el número total de células GBM viables después de uno, dos, tres, cuatro, o cinco días de ser cultivadas con medios que contienen los componentes indicados.

50 La figura 4 es un gráfico que representa el número total de células GBM viables después de cinco días de ser cultivadas con medios indicados.

La figura 5 es un gráfico que representa el número total de MSC después de tres, cuatro, o cinco días de ser cultivadas con medios que contienen los componentes indicados.

55 La figura 6 es un gráfico que representa el número de células GBM después de tres, seis, y nueve días de ser cultivadas con el Medio Neurobasal (Invitrogen, Grand Island, NY) que contiene los componentes indicados.

La figura 7 es un gráfico que representa el porcentaje de células GBM CD 133, CD 105, y CD90 positivas después de ser cultivadas con el medio base neural que contiene los componentes indicados.

5 La figura 8 es un gráfico que representa la cantidad de VEGF (pg/mL) presente en las preparaciones indicadas. MM = plaquetas de aféresis mínimamente manipuladas de donaciones vencidos que no fueron congeladas (3 bolsas se combinaron). PPP = plasma pobre en plaquetas, que es una fracción de plaquetas de aféresis mínimamente manipuladas que se centrifugaron a 3000 g durante cinco minutos y luego se centrifugaron a 10,000 g durante un minuto. FT = fracción congelación/descongelación, que plaquetas de aféresis manipuladas mínimamente que fueron sometidos a dos ciclos de congelación/descongelación. PL = lisado plaquetario preparado como se describe en el Ejemplo 2. MM, PPP, FT, y PL se obtuvieron a partir del mismo material de partida y se almacenaron durante más de dos meses a 4°C.

10 La figura 9 demuestra que los niveles de factores de crecimiento (VEGF y PDGF) son consistentes a través de diferentes lotes de lisados plaquetarios manufacturados. Los niveles de estos factores de crecimiento son significativamente más altos en las preparaciones de productos finales en comparación con otros suplementos de factores de crecimiento como suero fetal bovino, suero fetal de ternera, suero AB humano, y otra preparación de lisado plaquetario disponible comercialmente.

15 La figura 10 es un gráfico que representa las cantidades típicas de los factores de crecimiento indicados encontrados en los lisados plaquetarios manufacturados. Once productos de lisado plaquetario manufacturados (Producción PL) se realizaron mediciones de los factores de crecimiento indicados mediante ELISA. El factor de crecimiento y el eje que utiliza se indican a continuación las columnas. También se midió la cantidad de los factores de crecimiento indicados presentes dentro de suero fetal bovino (FBS).

20 La figura 11 es un gráfico que representa la cantidad de FGF (pg/mL) medida en los lisados plaquetarios producidos como se describe en este documento (n = 11) y en los lisados plaquetarios disponibles comercialmente (Cryocheck; n = 4).

25 La figura 12 es un gráfico que representa la cantidad de PDGF-BB (ng/mL) medida en los lisados plaquetarios producidos como se describe en este documento (n = 11), suero AB humano (HABS; n = 4), suero fetal bovino (FBS; n = 4), lisados plaquetarios disponibles comercialmente (Cryocheck; n = 4), y plasma fresco sin plaquetas (n = 4).

La figura 13 es un gráfico que representa la cantidad de IGF-1 (ng/mL) medida en los lisados plaquetarios producidos como se describe en este documento (n = 11), suero AB humano (HABS; n = 4), suero fetal bovino (FBS; n = 4), lisados plaquetarios disponibles comercialmente (Cryocheck; n = 3), y plasma fresco sin plaquetas (n = 4).

30 La figura 14 es un gráfico que representa la cantidad de TGF- β (ng/mL) medida en los lisados plaquetarios producidos como se describe en este documento (n = 11), suero AB humano (HABS; n = 4), suero fetal bovino (FBS; n = 4), lisados plaquetarios disponibles comercialmente (Cryocheck; n = 4), y plasma fresco sin plaquetas (n = 4).

35 La figura 15 es un gráfico que representa la cantidad de proteína total (mg/mL) medida en lisados plaquetarios producidos como se describe en este documento (n = 11), suero AB humano (HABS; n = 4), suero fetal bovino (FBS; n = 4), lisados plaquetarios disponibles comercialmente (Cryocheck PL; n = 3), y plasma fresco sin plaquetas (n = 3).

40 La figura 16 contiene un gráfico que representa el potencial de proliferación de las células y presencia de PDGF en PL fraccionada utilizando filtros de corte de peso molecular. La proliferación celular calculó el número de células después de 800 células/pozo se sembraron y se cultivaron durante cuatro días que contienen el componente indicado y un gráfico que representa la cantidad de PDGF-BB (ng/mL) medida mediante ELISA en el componente indicado. HCTL PL = 5% de PL utilizando MEM avanzado como medio base.

La figura 17 contiene un gráfico (arriba) que representa la A₂₈₀ para las fracciones indicadas de PL aisladas por fraccionamiento tamaño y una fotografía (abajo) de un gel reductor teñido con plata que contiene las fracciones indicadas.

45 La figura 18 es una fotografía electrónica de barrido de los complejos presentes con un lisado plaquetario producido como se describe en el Ejemplo 2.

La figura 19 es un gráfico que representa la cantidad de la citoquina o factor de crecimiento indicado presente dentro de lisados plaquetarios.

50 La figura 20 contiene cuatro gráficos que comparan los niveles de PDGF-BB, FGF, TGF- β 1, e IGF-1 presente con lisados plaquetarios producidos como se describe en el Ejemplo 2 (producción HCTL) a los niveles de PDGF-BB, FGF, TGF- β 1 e IGF-1 se informó en las referencias indicadas o de suero bovino. Lange et al. es la referencia Lange et al. (Cellular Therapy and Transplantation, 1(2) December (2008)); Weibrich et al. es la referencia Weibrich et al. (Craniomaxillofac Surg., 30: 97-102 (2002)); y Doucet et al. es la Doucet et al. referencia (Fisiología Celular J., 205: 228-236 (2005)).

- La figura 21 es un gráfico que representa la proliferación relativa (absorbancia) para las MSC cultivadas como se indica.
- La figura 22 es un gráfico que representa el recuento de células para las células madre adultas cultivadas para el número indicado de días en un medio (medio esencial alfa mínimo (α -MEM)) suplementado con 5 por ciento de un lisado plaquetario producido como se describe en el Ejemplo 2 o medio suplementado con 10 por ciento de suero fetal de ternera.
- La figura 23 es un gráfico que representa las duplicaciones de la población para las MSC cultivadas en el medio indicado.
- Figuras 24A es una tabla con los resultados del cultivo celular tumorales primarias con medios indicados, y las figuras 24B, 24C, 24D, 24E y contienen datos relativos a los cultivos celulares GBM103, GBM106, GBM110, y GBM111, respectivamente.
- La figura 25 contiene cuatro gráficos que representan el número de células en el día indicado para las células tumorales primarias cultivadas en PL (medio AIM-V suplementado con 5% de lisado plaquetario como por ejemplo 2), medio NSC (medio Neurobasal-A con los suplementos de N2 y B27 y EGF y FGF), o DMEM 10% de FBS.
- La figura 26 es un gráfico que representa el porcentaje positivo de células dendríticas para el marcador indicado de monocitos CD14+ cultivados ex-vivo con 1% de HABS en medio X-Vivo 15 (XV-HABS), 1% de medio X-Vivo 15 que contiene lisado plaquetario (XV-PL), o medio libre de suero CellGro (sin suplementos). Todas las indicaciones contenían 2800 UI de GM-CSF y 1000 UI de IL-4 para todo el curso del cultivo (seis días). Todas las condiciones tenían TNF- α y se adiciona PGE2 en el tercer día, y las células fueron fenotipadas en el día seis. Para XV-PL (3-6), el cultivo se incubó en HABS para los tres primeros días y PL para los dos últimos.
- La figura 27 es un gráfico que representa las MSC totales después de cinco días de cultivo con las composiciones indicadas.
- La figura 28. Efecto de las condiciones de cultivo en la adhesión celular. Tumores (en filas) eran física y enzimáticamente digeridas y se incubaron en tres condiciones de cultivo (NSC, células madre neural; PL, lisado plaquetario, o FBS, suero fetal bovino). Las células fueron fotografiadas y descripciones de la morfología enumeradas.
- La figura 29. PL promueve un rápido crecimiento de cultivos primarios de GBM. Ejemplo de cinética de crecimiento de un tumor primario cultivado en cada suplemento del medio (panel izquierdo), y el total de células obtenidas después de 20-30 días de cultivo para múltiples aislados tumorales (panel derecho). PL fue superior en el número de células cultivadas independientes del tumor individual ($p = 0.05$; $n = 8$).
- La figura 30 es un gráfico que representa el crecimiento celular observado con la cantidad indicada de lisado plaquetario (PL).
- Figura 31. Presencia de PDGF y FGF en PL después de 48 días de incubación a diferentes temperaturas. Muestras de PL se incubaron a las temperaturas identificadas para cuatro lotes distintos de PL. Los factores de crecimiento se midieron por ELISA. Cada punto representa la media de tres muestras de ese lote incubadas a esa temperatura. Los datos representados son las medias de cada uno de estos lotes. Las barras son la media de cuatro lotes, con los cambios representados por asterisco ($p < 0.05$ para muestras de pares).
- La figura 32 es un gráfico que representa la cantidad de PDFG y FGF en muestras de PL incubadas a las temperaturas indicadas.
- La figura 33 es un gráfico que representa la cantidad de PDFG en las muestras de PL incubadas a las temperaturas indicadas.
- La figura 34 es un gráfico que representa la velocidad de desintegración de PDFG.
- Descripción detallada
- Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con las composiciones que contienen los contenidos plaquetarios (por ejemplo, lisados plaquetarios y/o sobrenadantes filtrados o desde un medio que contiene plaquetas). Por ejemplo, este documento se refiere a métodos y materiales para la fabricación y uso de composiciones que tienen contenidos plaquetarios. Cualquier fuente apropiada de plaquetas se puede utilizar para hacer una composición que tiene contenidos plaquetarios. Por ejemplo, plaquetas de aféresis y plaquetas derivadas de la donación de sangre normal se pueden utilizar como una fuente de plaquetas para la fabricación de una composición de lisado plaquetario, un sobrenadante o filtrado de un medio que contiene plaquetas, o un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas.

- En una realización, una composición que tiene contenidos plaquetarios (por ejemplo, un lisado plaquetario) se puede obtener de la siguiente manera. Una vez obtenido, los contenidos plaquetarios pueden ser liberados utilizando cualquier método apropiado, incluyendo, sin limitación, un único ciclo de congelación/descongelación, ciclos repetidos de congelación/descongelación (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más), lisis con detergente, activación con trombina, colágeno, tromboxano A2, ADP u otros factores, y manipulación de fuerza iónica. En algunos casos, dos ciclos de congelación/descongelación se pueden utilizar para obtener las plaquetas lisadas. Una vez lisadas, la preparación plaquetaria lisada se puede centrifugar para obtener un sobrenadante. En general, la fuerza de centrifugación puede ser entre 2000 x g y 5000 x g, y la duración puede ser entre 10 minutos y 60 minutos. Por ejemplo, una preparación plaquetaria lisada se puede centrifugar a aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 30 minutos. Una vez que se recogió el sobrenadante, este se puede filtrar. Por ejemplo, el sobrenadante se puede filtrar a través de un filtro de 0.45 µm, un filtro de 0.2 µm, o un filtro de 0.45 µm, seguido de un filtro de 0.2 µm. El filtrado resultante se puede utilizar como una composición de lisado plaquetario sin procesamiento adicional o se puede combinar con heparina para formar una composición de lisado plaquetario.
- Un lisado plaquetario proporcionado en este documento se puede preparar sin el lavado de las plaquetas antes de la lisis de estas. En tales casos, el lisado plaquetario puede incluir plasma y componentes de plasma. Por ejemplo, un lisado plaquetario proporcionado en este documento puede incluir albúmina y/o trombina a aproximadamente concentraciones fisiológicas. En algunos casos, un lisado plaquetario proporcionado en este documento puede incluir contenidos plaquetarios preparados a partir de las plaquetas lisadas en presencia de plasma o de una composición similar al plasma.
- En otra realización, una composición que tiene contenidos plaquetarios (por ejemplo, un sobrenadante o filtrado de medio que contiene plaquetas) se puede obtener de la siguiente manera. Las plaquetas se pueden mantener entre 2°C y 42°C (por ejemplo, entre 2°C y 40°C, entre 2°C y 38°C, entre 2°C y 36°C, entre 2°C y 30°C, entre 5°C y 36°C, entre 10°C y 36°C, entre 15°C y 36°C, entre 20°C y 30°C) durante un período de tiempo (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, o más días) en presencia de plasma sin realizar un paso activo diseñado para lisar las plaquetas. Por ejemplo, una preparación plaquetaria (por ejemplo, preparación plaquetaria vencida) obtenida a partir de una técnica de aféresis se puede utilizar sin necesidad de retirar el plasma. Una vez obtenida, la preparación plaquetaria se puede tratar para eliminar plaquetas, residuos de plaquetas, o fantasmas de plaquetas, mientras que la obtención del medio resultante que incluye contenidos plaquetarios y componentes del plasma. Por ejemplo, este medio resultante puede obtenerse por centrifugación y/o filtración. Una vez obtenido, el medio resultante se puede almacenar o utilizar como una composición que tiene contenidos plaquetarios o un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas como se describe en este documento.
- Las composiciones que tienen contenidos plaquetarios (por ejemplo, composiciones de lisado plaquetario) proporcionadas en este documento se pueden formular con cualquier medio apropiado para producir un medio de cultivo que tiene propiedades mejoradas. Ejemplos de medio que puede ser suplementado con una composición proporcionada en este documento incluyen, sin limitación, DMEM, RPMI, AIMV, X-VIVO15, y otros medios libres de suero o suero que requiere definidos. Cualquier cantidad apropiada de una composición que tiene contenidos plaquetarios proporcionadas en este documento se puede adicionar a un medio. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más por ciento (por ejemplo, vol/vol) de un medio puede ser una composición de lisado plaquetario o un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas proporcionada en este documento. Tales medios suplementados se pueden utilizar para promover un mayor crecimiento de células (por ejemplo, células progenitoras adultas normales, células madre, células precursoras, células de fibroblastos, y células mesenquimales del estroma, para diferenciar células progenitoras, células madre, y células precursoras en subtipos funcionales de manera eficiente, para promover un mayor crecimiento de las células madre tumorales en cultivos de tumor primario, para establecer líneas de células tumorales, o para generar cultivos de células primarias (por ejemplo, líneas de células de tumor) de manera eficiente. Como se describe en este documento, las composiciones que contienen los contenidos plaquetarios (por ejemplo, composiciones de lisado plaquetario) proporcionados en este documento se pueden utilizar para obtener la cinética de crecimiento superior cuando el cultivo celular (por ejemplo, células progenitoras y células madre tumorales) en comparación con los cultivos utilizando la administración de suplementos de suero humano, suero fetal bovino, o medio libre de suero con suplementos de factores de crecimiento recombinante.
- Las composiciones que tienen contenidos plaquetarios (por ejemplo, composiciones de lisado plaquetario) proporcionados en este documento pueden ser utilizados para suplementar los medios utilizados para cultivar células de cualquier especie, incluyendo, sin limitación, seres humanos, monos, caballos, perros, gatos, ratas o ratones.
- Cualquier método apropiado se puede utilizar para obtener células diferenciadas a partir de células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales). Por ejemplo, las células diferenciadas se pueden derivar de las células madre mesenquimales mediante la incubación de las células madre mesenquimales con una composición (por ejemplo, medios de cultivo) que contienen uno o más factores, junto con una composición que tiene contenidos plaquetarios (por ejemplo, una composición de lisado plaquetario) proporcionada en este documento. Los factores pueden ser cualquier tipo de factores, tales como polipéptidos, esteroides, hormonas, y moléculas pequeñas. Ejemplos de tales factores pueden incluir, sin limitación, dexametasona, EGF, FGF y BMP4. Las células madre se pueden incubar con tales composiciones durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,

22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días. En algunos casos, una composición proporcionada en este documento y se utiliza para promover el crecimiento o diferenciación celular puede ser sustituidos cada día o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más días.

5 Una vez que las células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales) han sido incubada con una composición proporcionada en este documento o de otra manera tratadas con factores de diferenciación, el estado de diferenciación se puede supervisar para determinar si las células madre diferenciadas en células diferenciadas que tienen un deseado fenotipo. Por ejemplo, una muestra de células se puede recolectar y evaluar mediante técnicas tales como transferencia Western, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunotinción, microscopía confocal láser, y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción (RT-PCR) (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa).

10 Este documento también proporciona cultivos de células aisladas. Por ejemplo, este documento proporciona cultivos de células del tumor primario aislados, tales como un cultivo celular GBM106 o cualquier otro cultivo de células tumorales identificado en la Figura 24A. Se observa que los aislados de cultivos de células de tumores primarios identificados en la Figura 24A se pueden designar con un prefijo "MC" cuando se ha establecido el uso de una composición que tiene contenidos plaquetarios proporcionada en este documento. Por ejemplo, el cultivo celular GBM106 obtenido utilizando un lisado plaquetario proporcionado en este documento puede ser designado como MCGBM106. Del mismo modo, el cultivo celular GBM110 obtenido utilizando un lisado plaquetario proporcionado en este documento puede ser designado como MCGBM110, y así sucesivamente. Un cultivo de células tumorales primario aislado proporcionado en este documento se puede obtener de un paciente humano y se cultiva en presencia de medio suplementado con una composición que tiene contenidos plaquetarios. Por ejemplo, un medio que contiene entre 1 por ciento y 50 por ciento (por ejemplo, entre 1 por ciento y 45 por ciento, entre 1 por ciento y 35 por ciento, entre 1 por ciento y 25 por ciento, entre 1 por ciento y 15 por ciento, entre 1 por ciento y 10 por ciento, entre 1 por ciento y 5 por ciento, entre 5 por ciento y 50 por ciento, entre 10 por ciento y 50 por ciento, entre 20 por ciento y 50 por ciento, entre 3 por ciento y 10 por ciento, o entre 3 por ciento y 7 por ciento) de un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas proporcionado en este documento se puede utilizar para cultivar células de glioma primarias humanas.

15 Las células (por ejemplo, células tumorales primarias) cultivadas como se describe en este documento pueden exhibir una cinética de crecimiento rápido (Figuras 1 y 29), una frecuencia más alta de establecimiento de línea celular (Figuras 24A-E), y genética estable (Figura 1). Con referencia a la figura 1, se observa que el cariotipo de las células cultivadas con el HCTL # 3 y el medio NSC pueden ser muy similares, mientras que el cariotipo de las células cultivadas con FBS puede ser diferente. Esto se hizo a partir de una sola muestra de tumor. Por lo tanto, las células cultivadas de FBS evolucionaron lejos de las otras dos líneas celulares. Las otras dos líneas celulares son muy similares lo que sugiere que estas dos reflejan el tumor progenitor.

20 En algunos casos, las células tumorales primarias cultivadas como se describe en este documento pueden presentar un tiempo de duplicación constante (Figura 29). Un tiempo de duplicación constante puede indicar que no hay tiempo de retraso importante en el establecimiento del cultivo. Por lo tanto, no hay otros factores necesarios que requieren reordenamientos genéticos/o aditivos para hacer que los cultivos se desarrollen.

25 Las células tumorales primarias cultivadas como se describe en este documento también pueden exhibir la presencia de células con fenotipos progenitores. Un ejemplo de expresión de SOX2 y CD 133 en un cultivo de tumor primario se proporciona en la Figura 1. SOX2 y CD 133 son marcadores de células progenitoras asociadas con células progenitoras tumorales (células madre tumorales). Las células tumorales primarias cultivadas como se describe en este documento pueden ser GMP compatible desde el suplemento (por ejemplo, una composición que tiene contenidos plaquetarios, tales como un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas) pueden ser compatibles con GMP.

30 En algunos casos, las células tumorales primarias cultivadas como se describe en este documento pueden ser biológicamente relevantes en que muchos tumores se asocian con la formación de coágulos de sangre. Aunque no se está limitado a ningún modo de acción particular, un coágulo de sangre puede actuar como una matriz in vivo para la recolección de los sobrenadantes de plaquetas. Por lo tanto, una composición que tiene contenidos plaquetarios proporcionada en este documento puede imitar la biología normal del tumor.

35 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Fuente de plaquetas

40 Todos los donantes que donan plaquetas de aféresis cumplieron con los criterios de elegibilidad según lo definido por AABB Standards for Blood Banks and Transfusion Service and the Food and Drug Administration. Los donantes fueron seleccionados utilizando el Uniform Donor History Questionnaire (UDQ) y los materiales educativos que se acompañan. Este cuestionario es un documento de selección creado por una coalición de reglamentación,

acreditación y las instituciones de recolección de sangre que consisten en the Food and Drug Administration, Centers for Disease Control and Prevention, Armed Services Blood Program, National Heart Lung and Blood Institute, American Blood Resources Association, AABB, American Red Cross, and America's Blood Centers. Información relativa al UDAQ se puede encontrar en la World Wide Web en "fda.gov/cber/dhq/dhq.htm."

- 5 Todas las donaciones de plaquetas aféresis fueron probadas con las siguientes pruebas de enfermedades infecciosas: (1) prueba serológica para la sífilis; (2) prueba de anticuerpos contra el virus HCV EIA-hepatitis C, (3) prueba de ácido nucleico del virus HCV NAT-hepatitis C, (4) prueba de antígeno de superficie HBsAg-hepatitis B, (6) anticuerpo del núcleo Anti-HBc-hepatitis B, (7) prueba de anticuerpos Virus 1/2 de Inmunodeficiencia humana-EIA VIH-1/2 - con capacidad para detectar VIH 1 subgrupo O; (8) prueba de ácido nucleico Virus de Inmunodeficiencia NAT- VIH Humano, (9) Tipos I/II virus T linfotrópico HTLV I/II EIA-humano, (10) prueba de ácido nucleico Virus del Nilo Occidental WNV NAT, y (8) Anti - T. cruzi, (prueba serológica para enfermedad de Chagas) utilizando procedimientos autorizados por la FDA.

- 15 Además de las pruebas anteriores, todos los productos de aféresis de plaquetas también fueron analizados para contaminación bacteriana. Veinticuatro horas después de la recolección, se volvió a suspender el producto, y se recolectaron 8 mL de la muestra. Cuatro mL de esta muestra se inocularon en una botella de cultivo anaeróbico, y 4 mL se inocularon en una botella aeróbica. Estas botellas se colocaron después en un sistema BacT/ALERT (bioMérieux, Durham, NC, Estados Unidos) en un plazo de tres horas de la inoculación y se monitorearon para la generación de CO₂ durante 24 horas. Si no se detectó después de 24 horas la producción de CO₂, los productos de plaquetas fueron liberados y puestos a disposición para la transfusión. Se continúa motorizando las botellas de cultivo durante el tiempo de conservación restante del producto de plaquetas (un total de cinco días, tres días adicionales después de la liberación).

- 25 Los productos de plaquetas que se liberan para la fabricación de medios de cultivo se recolectaron a partir de donantes que cumplan los criterios de donación, eran pruebas negativas para las enfermedades infecciosas mencionadas anteriormente, y no mostraban evidencia de crecimiento bacteriano por su fecha de caducidad. Productos procedentes de donantes que no cumplían criterios de los donantes, que mostraron pruebas de enfermedades infecciosas positivas, o que los cultivos producidos positivos para las bacterias fueron considerados residuos biológicos peligrosos. Estos productos fueron puestos en cuarentena y destruidos. Estos no fueron puestos en libertad para la fabricación de un medio de cultivo de lisado plaquetario. Las pruebas y directrices de FDA para la liberación pueden cambiar. Sin embargo, las plaquetas utilizadas para estos fines cumplieron las pruebas y directrices de FDA actuales en el momento de la producción.

Ejemplo 2 - Preparación de lisado plaquetario a partir de plaquetas de aféresis

- 35 Se obtuvieron plaquetas de aféresis como se describe en el Ejemplo 1. Las plaquetas de aféresis utilizadas fueron de no más de cuatro días de caducidad. Un solo lote de lisado plaquetario consistió en diez unidades de aféresis de plaquetas individuales, y un lote fue utilizado a la vez para crear un producto de lisado plaquetario. El procesamiento de los reactivos de grado clínico se puede llevar a cabo en un alojamiento de sala limpia. Diez unidades de plaquetas de aféresis individuales fueron congeladas a -70°C o menos. Después de haber sido congeladas durante al menos 24 horas, las unidades se retiraron del congelador y se dejan descongelar. Las unidades se descongelaron a temperatura ambiente o a temperaturas de refrigeración. Después de que la descongelación se había completado, cada unidad se mezcló masajeando la bolsa. Cada bolsa de plaquetas descongeladas se coloca plana (para minimizar la rotura de la tubería) en un congelador superfrío (-70°C o menos) para una segunda congelación. Después de que las unidades de plaquetas de aféresis se congelaron durante al menos 24 horas para una segunda congelación, se retiraron del congelador y se dejan descongelar. Después de la segunda descongelación, el producto de plaquetas se transfirió asépticamente a tubos cónicos de centrifuga de 250 mL. Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 3000 xg durante 30 minutos a temperatura ambiente utilizando un Centrifuga Benchtop Centrifuge Sorvall Legend T. Los sobrenadantes resultantes fueron transferidos a unidades de filtro de 0.45 micras (Pall Stericup, Catalog Number SCHV U05 RE; East Hills, NY o Nalgene Filter System, Catalog Number 167-0045; Rochester, NY) que fueron pre-equipado con uno o más pre-filtros (filtros de microfibras de vidrio GF/B o GF/D utilizados de manera intercambiable; Whatman®, Florham Park, NJ). La unidad de filtro se conectó a una fuente de vacío y se dejó filtrar el producto. Si el producto no filtra por completo, el producto no filtrado se transfirió a otra unidad de filtro con un pre-filtro. Los filtrados de todas las unidades de filtro de 0.45 micras se agruparon y se filtraron a través de una unidad de filtro de 0.2 micras (Pall Stericup, Catalog Number SCHV U05 RE; East Hills, NY o Nalgene Filter System, Catalog Number 567-0020; Rochester, NY) que fue pre-equipada con uno o más pre-filtros (filtros de microfibras de vidrio GF/B o GF/D utilizados de manera intercambiable; Whatman®, Florham Park, NJ). La unidad de filtro se conectó a una fuente de vacío y se dejó filtrar el producto. Si el producto no filtra por completo, el producto no filtrado se transfirió a una segunda unidad de filtro, y se repitió el proceso según sea necesario. Los filtrados de 0.2 micras se combinaron en botellas receptoras.

- 60 Un conjunto de transferencia de plasma se encuentra conectado a una jeringa de 60 mL, y el conjunto de transferencia, se agrega en una bolsa de sangre de 2L. Utilizando la jeringa como un embudo, los lisados filtrados de las unidades de plaquetas de aféresis se combinaron en la bolsa de 2L. Los contenidos se mezclaron bien. Se adicionó heparina (1000 U/mL) a los lisados plaquetarios filtrados para obtener una concentración final de dos U/mL.

Los lisados se dividieron en partes alícuotas. Los lisados se almacenaron congelados a $\leq 20^{\circ}\text{C}$ o inferior.

Una de las alícuotas que contiene el lisado plaquetario se utilizó para llevar a cabo las siguientes pruebas, para determinar si liberar o no la preparación de lisado plaquetario para su uso:

5 Cultivo aerobio. Un mL de lisado plaquetario se transfirió a una botella de cultivo de sangre Peds Bactec (Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD) que se utilizó para probar la esterilidad.

10 Cultivo anaeróbico. Ocho mL de lisado plaquetario se transfirieron a una botella Bactec Lytic/10 Anaerobic/F (Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD). En pocas palabras, botellas tanto aeróbicas como anaeróbicas son cargados en el instrumento BACTEC 9240 (Becton, Dickinson and Company; Sparks, MD) y controlados cada cuatro horas durante 14 días. Después de 14 días, se informan a cabo cultivos negativos como "No hay crecimiento a los 14 días", los cultivos positivos se subcultivan y se identifican los aislados.

15 Ensayo de endotoxina. Un mL de lisado plaquetario se transfirió a un tubo estéril libre de endotoxina que se utilizó para llevar a cabo un ensayo de endotoxina. En resumen, una dilución 1:50 de lisado plaquetario con lisado de Limulus Amebocyte (LAL). Reactivo de agua se analizó en el sistema Endosafe Portable Test (PTS; Charles River, Wilmington, MA). El PTS Endosafe utiliza metodología cinética cromogénica LAL para medir la intensidad del color directamente relacionada con la concentración de endotoxina en una muestra. Cada cartucho desechable contiene cantidades precisas de reactivo LAL con licencia, sustrato cromogénico, y endotoxina estándar control. El resultado obtenido de cada lote de lisado plaquetario debe ser <0.500 unidades de endotoxina (EU)/mL.

20 Cinética de células. Se preparó un lote (≥ 150 mL) de medio de lisado plaquetario al 5% (PL al 5%) que contienen Advanced MEM (120 mL), GlutaMAX (1.2 mL), heparina (~ 0.24 mL), y 5% de lisado plaquetario (6.4 mL). Un vial de células madre mesenquimales previamente congeladas (células de referencia) se descongelaron en un baño de agua a 37°C . Una vez descongelado, las células se colocaron en un tubo estéril de 50 mL con aproximadamente 5 mL del medio de PL al 5%. El tubo se centrifugó a $240 \times g$ durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante del tubo, y se adicionó un mL del medio de PL al 5% al pellet celular. Se realizó un recuento de células. Las células descongeladas se colocaron en una a dos matraces de 175 cm^2 con 50 mL de PL5% de manera que cada matraz contenía 1.75×10^5 - 4.38×10^5 de las células descongeladas. Los matraces se incubaron a 37°C en una incubadora de CO_2 al 5 por ciento. Las células se pasaron utilizando TrypLE™ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) después de los matraces fueron confluentes. Se combinaron las células, y se realiza un recuento de células. Se realizó un cálculo de duplicación de la población.

30 Citometría de flujo. Las células del ensayo de cinética celular se evaluaron utilizando el siguiente panel de citometría de flujo:

Tubo #	FITC	PE
1	IgG1	IgG1
2	IgG2	IgG2
3	CD90	CD73
4	CD105	HLA-DR
5	CD44	HLA-ABC
6	CD45	CD14

Lisados plaquetarios que eran estériles, libres de endotoxinas, crecieron MSC con el perfil de expresión de CD105, CD90, CD73, HLA-ABC positivo y negativo para CD14, CD45 y HLA-DR fueron liberados para uso clínico y se les asignó una fecha de caducidad de dos años a partir de la producción.

35 **Ejemplo 3 - Cultivo celular con lisados plaquetarios**

40 Las características fenotípicas de las células GBM cultivadas con medios que contenían lisados plaquetarios se compararon con los de las células GBM cultivadas utilizando medios NSC (medios Neurobasal (Invitrogen, Grand Island NY); EGF recombinante y FGF (R & D Systems, Minneapolis, MN), suplementos de N2 y B27 (Invitrogen, Grand Island NY), glutamina y penicilina/estreptomina) o DMEM que contenía FBS al 10%. El medio que contiene lisado plaquetario (HCTL#3) consistía de medio Neurobasal suplementado con 5% de lisado plaquetario, glutamina y penicilina/estreptomina. Las células cultivadas en medios NSC forman neuroesferas clásicas enriquecidas en células madre tumorales (Figura 1A). Las células cultivadas en DMEM 10% de FBS se convirtieron en adherentes y por lo general se diferenciaron (Figura 1A). Las células cultivadas en HCTL# 3 resultó en una población mixta de neuroesferas flotantes libres y neuroesferas adherentes con cinética de crecimiento superior (Figura 1A y 1B). Las

células cultivadas en HCTL#3 también mostraron muchos aspectos de las células madre tumorales neuronales y fueron positivos para CD133, nestina, y SOX2 (Figura 1C). Además, las células cultivadas en HCTL#3 fueron citogenéticamente anormales como ve a menudo en los tumores de GBM primarios (Figura 1D; Kitange et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 15(3):197-203 (2003)).

5 Resultados adicionales del cultivo de células tumorales primarias se presentan en las Figuras 24A-E y 25. Estos resultados además demuestran que los lisados plaquetarios proporcionados en este documento pueden realizar mejor que de suero fetal de ternera y un medio suplementado definido (NSC) para el cultivo de células tumorales primario (por ejemplo, gliomas) (Figuras 24A-E). Estos resultados también demuestran que medios que contiene lisados plaquetarios pueden desarrollar tumores en menos tiempo (Figura 25).

10 Las células tumorales cultivadas en medios suplementados con lisado plaquetario fabricado se enriquecieron para antígenos tumorales primarios asociados a GBM que eran similares, si no superiores, a las células cultivadas en medios NSC (Figura 2). Como tal, medios suplementados con PL aceptan la generación de cultivos de células primarias de pacientes de GBM que mostraron una cinética de crecimiento superior, reordenamientos genéticos tumorales característicos, poblaciones de células madre tumorales neurales, y enriquecimiento en ciertos antígenos tumorales. El uso de lisados de cultivos tumorales autólogos como antígeno para la inmunoterapia DC ofrece la ventaja de apuntar los antígenos tumorales múltiples reflectantes de perfil antígeno del paciente, eliminando las células contaminantes, y disponibilidad de antígeno suficiente para múltiples inmunizaciones. Las investigaciones preliminares en pacientes con GBM demostró la capacidad constante para generar cultivos primarios de tumores de pequeñas porciones de tumor resecado.

20 Las células cultivadas a partir de un tumor cerebral primario se descongelaron y se sembraron (3.5×10^4 células/pozo) en uno de los siguientes medios de cultivo: medios Neurobasal (Invitrogen, Grand Island, NY), más el 5% lisado plaquetario totalmente fabricado (lisado plaquetario), medio neurobasal al 5 por ciento de lisado plaquetario de un solo ciclo de congelación/descongelación sin transformar (Min. manipulado), medio neurobasal 5 por ciento de suero humano AB (HABS, Sigma, St. Louis, MO), medios Neurobasal solos, Neurobasal medio que contiene 5 por ciento plasma rico en plaquetas (PRP), medio Neurobasal que contiene 5 por ciento de plasma rico en plaquetas que se sometió a ultrasonidos (PRP-sonicada), y medio Neurobasal que contiene 5 por ciento de un lisado plaquetario disponible comercialmente (Cat. No. PNP-10, Lot No. PL14, Precision Biologic, Dartmouth, Nova Scotia). Igual número de células se sembraron por duplicado para cada condición. Las células se cultivaron durante cinco días, y el número total de células viables se contó cada día (Figura 3). Los resultados de día 5 se presentan en la Figura 4. Estos resultados demuestran que, en este experimento, las células tumorales crecieron mejor en lisado plaquetario totalmente fabricado.

35 MSC se descongelaron y cultivaron en Advanced MEM (Invitrogen, Grand Island, NY) más 5% de HCTL lisado plaquetario fabricado hasta confluencia. A continuación, las células se pasaron y se dividieron en Advanced MEM con los siguientes suplementos: 5 por ciento (vol/vol) de un lisado plaquetario preparado como se describe en el Ejemplo 2, plasma pobre en plaquetas (plasma pobre en Plt), plaquetas enteras (plts enteros) o plaquetas expuestas a dos ciclos de congelación/descongelación sin procedimiento adicional (congelación/descongelación plts.). El lisado plaquetario al 5 por ciento fue utilizado como línea de base con los otros que se ajustan para proporcionar una concentración de proteína equivalente como el 5 por ciento de lisado plaquetario. Las células se dejaron equilibrar en sus medios específicos durante unos días antes de comenzar el experimento. Una vez preparado, las MSC se sembraron a 2.5×10^4 células/placa en matraces T25 con su medio apropiado. El número total de células en cada uno de tres matraces para cada condición se contó en los días tres, cuatro y cinco (Figura 5). Estos resultados demuestran que las MSC crecieron mejor en HCTL lisado completamente fabricado.

45 Una línea de células de un tumor primario se descongeló y se sembró en placas de manera similar al experimento de crecimiento de MSC. Las células acondicionadas se sembraron a 8×10^4 células/placa en Medio Neurobasal (Grand Island, NY) suplementado con 5 por ciento (vol/vol) de un lisado plaquetario (PL) preparado como se describe en el Ejemplo 2, plasma pobre en plaquetas (plasma pobre plt o PPP), plaquetas enteras (plts enteras o WP) o plaquetas expuestas a dos ciclos de congelación/descongelación sin procedimiento adicional (congelación/descongelación plts o FT). El lisado plaquetario al 5 por ciento fue utilizado como línea de base con los otros que se ajustan para proporcionar una concentración de proteína equivalente como el lisado plaquetario al 5 por ciento. Las células se dejaron equilibrar en sus medios específicos durante unos días antes de comenzar el experimento. El número total de células en cada uno de tres matraces para cada condición se contó en los días tres, seis y nueve (Figura 6). Estos resultados demuestran que las células crecieron mejor en lisado plaquetario totalmente fabricado más de 6 días.

55 En el día 5, las células de cada matraz para cada tipo de condición particular se agruparon y se analizaron por FACS para CD133 (se evaluaron dos tubos), CD105 (un tubo), y CD90 (un tubo). Se determinó el porcentaje de células positivas para cada marcador (Figura 7). Estos resultados demuestran que las células cultivadas en lisado plaquetario totalmente fabricado fueron enriquecidas para células CD133+. La expresión CD133 se ha documentado como un marcador para las células madre iniciadoras de glioma (Singh et al., *Cancer Res.*, Sept 15;63(18):5821-8 (2003)).

En otro experimento, se determinó la cantidad de VEGF (pg/mL) presente en diversas preparaciones plaquetarias (Figura 8). Las preparaciones plaquetarias incluyen (1) plaquetas de aféresis mínimamente manipuladas (MM) de donaciones caducadas que no fueron congeladas (3 bolsas se combinaron), (2) plasma pobre en plaquetas (PPP), que fue una fracción de plaquetas de aféresis mínimamente manipuladas que se centrifugaron a 3000 g durante cinco minutos y luego se centrifuga a 10,000 g durante un minuto, (3) una fracción congelación/descongelación (FT), que contenía las plaquetas de aféresis mínimamente manipuladas que fueron sometidas a dos ciclos de congelación/descongelación, (4) lisado plaquetario (PL) preparado como se describe en el Ejemplo 2. Se obtuvieron las preparaciones de MM, PPP, FT, y PL del mismo material de partida y se almacenaron durante más de dos meses a 4°C. La preparación de PL exhibió el mayor nivel de VEGF (Figura 8). Estos resultados demuestran que nuestro proceso de fabricación aumenta la concentración de este factor de crecimiento y es más alta en la etapa final de fabricación.

Los experimentos posteriores demuestran que los niveles de VEGF y PDGF son consistentes a través de varios lotes diferentes de lisado plaquetario fabricados en el HCTL (14244, 14453, 14569, y 14593) (Figura 9). Además, estos factores de crecimiento son significativamente mayores en una base por volumen que el de otros suplementos de cultivo, incluyendo suero fetal bovino, suero fetal de ternera, suero AB humano, y otra preparación de lisado plaquetario disponible comercialmente (Cat. No. PNP-10, Lot No. PL14, Precision Biologic, Dartmouth, Nova Scotia).

En otro experimento, seis aislados de células estromales mesenquimales se dividieron y se cultivaron utilizando medio suplementado con 10% de FBS o 5% de PL. Después de 12 pasajes, las células se sometieron al análisis de cariotipo. Dos de los seis cultivos desarrollados en FBS tenían cariotipo anormal, mientras que ninguna de las líneas cultivadas en PL fueron anormales. Los cariotipos de las dos líneas anormales y sus análogos cultivados en PL se muestran en la Figura 35.

Además de la iniciación de los cultivos tumorales primarios derivados de pacientes con glioblastoma utilizando PL, se utilizaron PL para iniciar los cultivos de tumores primarios derivados a partir de muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes con carcinoma de células renales.

25 **Ejemplo 4 - Análisis de lisados plaquetarios**

Se analizaron once lotes de lisados plaquetarios fabricados como se describe en el Ejemplo 2 (Producción PL) para determinar la cantidad de EGF, FGF, IGF-1, PDGF-BB, TGF- β , y VEGF presente, medido por ELISA. Las cantidades medidas se compararon con las medidas en uno o más de los siguientes: suero fetal bovino (FBS), suero AB humano (HABS), un lisado plaquetario disponible comercialmente (Cryocheck; número de catálogo PNP-10; Precision BioLogic, Inc., Nova Scotia, Canada) y plasma fresco sin plaquetas. Las cantidades típicas de EGF, FGF, PDGF-BB, TGF- β , y VEGF dentro de los lotes fabricados de plaquetas en comparación con FBS se presentan en la Figura 10. La cantidad media de FGF dentro de los lotes fabricados de plaquetas fue de aproximadamente 180 pg/mL, mientras que la cantidad promedio presente en un lisado plaquetario disponibles en el mercado fue de 80 pg/mL (Figura 11). La cantidad promedio de PDGF-BB dentro de los lotes de plaquetas manufacturados fue alrededor de 8.5 ng/mL, mientras que la cantidad promedio presente en un lisado plaquetario disponibles en el mercado fue de 2.9 ng/mL (Figura 12). La cantidad promedio de IGF-1 dentro de los lotes fabricados de plaquetas fue aproximadamente 132 ng/mL, mientras que la cantidad media presente en un lisado plaquetario disponible en el mercado fue de 7.7 ng/mL (Figura 13). La cantidad media de TGF- β dentro de los lotes de plaquetas fabricados fue aproximadamente 54 ng/mL, mientras que la cantidad promedio presente en un lisado plaquetario disponible en el mercado fue 37 ng/mL (Figura 14). Los niveles de PDGF-BB, FGF, TGF- β , e IGF-1 presente en los lisados plaquetarios producidos como se describe en el Ejemplo 2 se compararon con los niveles de PDGF-BB, FGF, TGF- β , e IGF-1 reportados en la literatura o de suero bovino (Figura 20).

La cantidad total de proteína dentro de once lotes de lisados plaquetarios fabricados como se describe en el Ejemplo 2 se midió utilizando un ensayo de Bradford modificado. La cantidad promedio de proteína total dentro de los lotes de plaquetas fabricados fue aproximadamente 49 mg/mL, mientras que la cantidad media presente en los lisados plaquetarios disponibles en el mercado fue 0.03 mg/mL (Figura 15). La cantidad total de proteína dentro de los lotes de plaquetas fabricados fue similar a las cantidades medidas en el plasma fresco sin plaquetas, el suero fetal bovino, y el suero AB humano (Figura 15).

Estos resultados sugieren que la concentración del factor de crecimiento por sí solo no es responsable de las propiedades estimulantes de crecimiento efectivo de los lisados plaquetarios proporcionados en este documento. La media de los niveles de los factores de crecimiento presentes con los lisados de plaquetas proporcionados en este documento fue aproximadamente 2 a 3 veces la del lisado plaquetario disponibles comercialmente. Sin embargo, el lisado plaquetario disponibles en el mercado no fue diferente de suero fetal bovino. Además, los lisados plaquetarios proporcionados en este documento tenían aproximadamente 3000 veces la cantidad de proteína que la de los lisados plaquetarios disponibles en el mercado, sin embargo, la proteína sola no puede dar cuenta de la actividad como los lisados plaquetarios proporcionados en este documento, ya que exhibieron niveles similares de proteína total como la que se encuentra en el suero AB humano.

Se realizaron los siguientes experimentos para evaluar el tamaño del material dentro del lisado plaquetario proporcionado en este documento que contiene PDGF-BB y la capacidad para estimular la proliferación celular. En

resumen, los lisados plaquetarios se producen a partir de un concentrado de plaquetas vencido de un solo donante. El número de plaquetas para cada condición de lisis fue igual, y el volumen utilizado para lisar fue igual para todas las modificaciones e igual al volumen del concentrado de plaquetas utilizado para la condición no modificada. Los lisados plaquetarios se filtraron sobre filtros de selección de tamaño con puntos de corte específicos de peso molecular. El filtrado (menor que el tamaño indicado) y el retenido (mayor que el tamaño indicado) se analizaron para la presencia de PDGF-BB por ELISA y la capacidad de estimular la proliferación celular. Para evaluar la proliferación celular, placas de cultivo de tejidos de 96 pozos sembrados con 800 células MSC derivadas de tejido adiposo de adulto se utilizaron con Advanced MEM (Gibco) suplementado con 2 unidades/mL de heparina y una preparación de lisado plaquetario (5%; v/v). PDGF-BB tiene un peso molecular de aproximadamente 30 KDa (proteína de 30,000 MW).

PDGF-BB se observó sólo en los materiales retenidos incluyendo las preparaciones >100,000 que sugieren que la totalidad de la PDGF-BB está obligado a complejos mayores de este tamaño. También, la proliferación se produjo en cultivos que contienen estos complejos más grandes (>100,000 Da). Estos resultados indican que hay complejos de alto peso molecular que contienen factores de crecimiento que pueden ser responsables de la actividad de los lisados plaquetarios proporcionados en este documento.

Los factores de crecimiento y otras proteínas pequeñas se encuentran en complejos grandes en los lisados plaquetarios proporcionados en este documento. Un lisado plaquetario (0.5 mL), que se descongeló, se centrifugó a 3,000 x g, y se filtró a través de un filtro de 0.2 mm, se aplicó a una columna de 1.5 cm x 27 cm empaquetada con Sephadex G-150-120 (Pharmacia Fine Chemical Company) y equilibrada con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, solución reguladora pH 7.4. La cromatografía se desarrolla a una velocidad de flujo de 25 mL/hora, y se midió la A₂₈₀ de cada fracción. Las fracciones de columna se analizaron por SDS-PAGE utilizando un gel de 4-15% Criterion (Bio-Rad Laboratories) y tinción con plata. Este fue un análisis de exclusión por tamaño que dio lugar a los complejos más grandes que están en las primeras fracciones y los complejos/moléculas individuales más pequeñas que están en las fracciones posteriores.

Una fracción grande del lisado plaquetario fluyó de la columna de inmediato (Figura 17, parte superior). Para ver el tamaño de estos complejos, estas fracciones se corrieron en un gel reductor (Figura 17, parte inferior). Las primeras fracciones contenían proteínas con un peso molecular de menos de 25,000 Da, lo que sugiere que las proteínas pequeñas se unen a estos grandes complejos.

Una muestra de lisado plaquetario fabricada como se describe en el Ejemplo 2 se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido. Como se muestra en la Figura 18, varios complejos grandes son fácilmente observables. Se observaron muchas partículas de hasta 0.2 µm de tamaño.

En otro experimento, se evaluaron 1-4 lotes de lisados plaquetarios fabricados como se describe en el Ejemplo 2 para determinar la cantidad de 21 citocinas y factores de crecimiento presentes en los lisados plaquetarios, utilizando un ensayo BioPlex 26-plex (Biorad, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentan en la Figura 19.

Ejemplo 5 - Uso de cultivo celular de lisados plaquetarios

MSC se descongelaron y se cultivaron en α-MEM con PL al 5% hasta confluencia. Las células después se pasaron y se dividieron en medio α-MEM solamente o medio α-MEM con los siguientes suplementos: 5 por ciento (vol/vol) de Cryocheck, 10 por ciento (vol/vol) de FBS, 5 por ciento (vol/vol) de HABS, o 5 por ciento (vol/vol) de un lisado plaquetario preparado como se describe en el Ejemplo 2. La proliferación relativa se evaluó mediante mediciones de absorbancia. Se observó la mayor cantidad de proliferación con MSC cultivadas en presencia del lisado plaquetario preparado como se describe en el Ejemplo 2 (Figura 21).

En otros experimentos, se observe que las MSC de tejido adiposo se desarrollan más rápido en presencia de 5 por ciento de un lisado plaquetario producido como se describe en el Ejemplo 2 que en el 10 por ciento de suero fetal de ternera (Figuras 22 y 23).

Para determinar el efecto modulador inmune de PL, se utilizó PL como un suplemento en lugar de suero AB humano en el cultivo propicio para la diferenciación de CD14+ monocitos en las células inmunes estimulantes de las células dendríticas (descrito en Dietz et al., Transfusion, 46(12):2083-9 (2006)). PL se incubaron durante la condición de cultivo total o para la etapa final (día 3-6) de cultivo de células dendríticas característico de generación de dendrítica madura activa. Los cambios asociados en el cultivo se midieron con especial énfasis en la expresión de CD80 y CD83; dos marcadores característicos del cultivo de células dendríticas. No se observó efecto de la PL como un suplemento en estas condiciones. Por lo tanto, PL parece tener un efecto benigno en la respuesta inmune.

En otro experimento, las MSC se sembraron en medio, y el crecimiento celular se determinó por recuento. Los suplementos de medios fueron las siguientes: (a) ninguno (medios solamente), (b) PL # 1 (lisado plaquetario fabricado en presencia de plasma), (c) lavado PL # 1 + plasma (lisado plaquetario fabricado después de la eliminación de plasma seguido de la adición de plasma de nuevo), (d) PL # 1 lavado (lisado plaquetario fabricado después de la eliminación de plasma), (e) PL2 + benzamidina (lisado plaquetario fabricado en presencia de plasma,

más el inhibidor de la coagulación benzamidina), y (f) plaquetas lavadas (PC2) en solución reguladora (plaquetas fabricadas en ausencia de plasma). Se observó proliferación celular en células cultivadas con PL#1 y células cultivadas con PL#1+ plasma lavado (Figura 27). Poca o ninguna proliferación se observó con las células cultivadas en las otras condiciones (Figura 27). Estos resultados sugieren que tanto plasma como factores de coagulación pueden ser requeridos para producir una composición eficaz que contiene contenidos plaquetarios.

Ejemplo 6 – Establecimiento de alta eficiencia de cultivos primarios de glioblastoma para el descubrimiento de fármacos, optimización de fármacos y vacunas antitumorales

Se producen cultivos de células primarios glioblastoma multiforme (GBM) derivados del paciente aplicables para la traducción clínica. El medio de cultivo descrito en este documento que contiene contenidos plaquetarios se utiliza para un establecimiento altamente eficiente de cultivos de células tumorales. El medio es probablemente más relevante para el crecimiento del tumor que otros métodos y puede ser optimizado para la producción a gran escala clínica compatible con los requisitos de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP).

El efecto de los medios suplementados con contenidos plaquetarios sobre el cultivo tumoral se ensayó mediante el fraccionamiento de los tumores primarios y la incubación de ellos en uno de los tres métodos de cultivo. El primer cultivo incluye 10% de suero fetal de ternera (FCS o FBS) en medios de cultivo. El segundo cultivo contenía medio de cultivo utilizado para cultivar células madre tumorales (Medio de célula madre neural, NSC; Piccirillo y Vescovi, Expert Opinion on Biological Therapy, 7 (8): 1129 (2007); Fan et al, Seminars in Cancer Biology, 17 (3): 214 (2007)). El tercer medio de cultivo contenía medio suplementado con 5% de suplemento de medio derivado de plaquetas humanas (lisado plaquetario, PL).

El efecto de los medios suplementados fue claro (Figura 28). En respuesta a las condiciones de cultivo, las células autoadherentes que forman esferas, preferencialmente adheridas al plástico que forma monocapas, o cultivos con la adherencia mixto. Cultivos de FBS fueron monocapas uniformemente adherentes, con medios de NSC en su mayoría que tiene esferas o las células no adherentes. Cultivos PL existían dentro del espectro completo de la morfología celular. Las células continuaron en cultivo y se contaron en cada pase. PL fue superior a otros métodos en la capacidad de grandes números de células generados (Figura 29). Es importante destacar que las células cultivadas en PL demostraron una tasa de crecimiento constante durante más de 10 duplicaciones en ausencia de una fase inicial de retardo, lo que sugiere una respuesta de proliferación de inmediato sobre placas (Figura 29, panel izquierdo). Por lo tanto, PL induce la proliferación inmediata y profunda en muchos cultivos del tumor primario. De los dieciséis tumores cultivados hasta el momento, se obtuvo una tasa de éxito del 56% de establecer el crecimiento celular primario, y se obtuvo una tasa de 44% de la generación de más de 30 millones de células en 60 días. Ni un solo cultivo desarrollado en FBS podría cumplir este último requisito. El trece por ciento de los tumores que crecen en condiciones NSC cumplió con estos criterios. Curiosamente, había un cultivo celular que creció igualmente bien en PL y NSC, y sólo un cultivo celular que creció de forma única en NSC. En general, PL fueron mayores que 3 veces mejor en el establecimiento de cultivos primarios de tumores que el mejor método siguiente.

Una crítica de los cultivos celulares establecidos de FBS es que se considera que han perdido el carácter indiferenciado del tumor in vivo. Para determinar si las células cultivadas en PL tienen características de células madre tumorales, la expresión de nestina, Sox2, y CD133 se midió en células cultivadas PL. La mayoría de las células en todos los cultivos fueron nestina y Sox2 positivo. Cuatro de los siete cultivos ensayados para expresión CD133 tenían niveles por encima del fondo con un cultivo que tiene más de 30% de las células positivas para CD133. Estos resultados sugieren que de hecho los cultivos contienen células que tienen características de células madre tumorales.

Para determinar la estabilidad genética de los cultivos desarrollados en PL, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humanos de donantes no malignas fueron incubadas en medios suplementados con PL. No hay cariotipos anormales se encontraron en hasta doce pasajes de las células. Por lo tanto, PL mantiene la integridad genética de las células normales en cultivo. Cultivos GBM fueron cariotipados y se encontró que mantienen un cariotipo estable a pesar de duplicaciones celulares masivas (véase, por ejemplo, GBM106; Figura 24C). En algunos casos, los cultivos consistían de subclones estables. Los cultivos tumorales mostraron deleciones características (tales como pten) y expresan antígenos tumorales tales como EGFr, survivina, e IL-13 r. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que PL es un suplemento de crecimiento muy eficaz para establecimiento y proliferación de los cultivos de tumores primarios.

Un beneficio adicional de PL como un suplemento de crecimiento es su fuente. Las plaquetas humanas vencidas, aprobadas para uso humano, se utilizaron. Este material fue aprobado para uso terapéutico con todas las pruebas equivalente completadas.

Por lo tanto, los métodos y materiales proporcionados en este documento pueden permitir a la generación de células tumorales autólogas para su uso en vacunas específicas del paciente, u otros protocolos de modulación inmune donde pueda requerirse material específico del paciente. La eficiencia en la generación in vitro de decenas de millones de células de >40% de todos los tumores GBM puede permitir muchos nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer, incluyendo (a) la posibilidad de generar suficientes materiales específicos del paciente para las vacunaciones repetidas para protocolos de terapia inmune, (b) el establecimiento de una biblioteca de células del

tumor primario para la detección de fármacos en los cultivos de células que tienen sustancialmente menor número de pasajes y material más relevante, (c) el desarrollo de protocolos de selección de fármacos específicos para la optimización específica del paciente de quimioterapia, y (d) la catalogación de la perfil molecular de estos cultivos primarios de tumores y la asociación de estos perfiles con quimio-sensibilidad.

- 5 Se realizó un ensayo clínico para confirmar el uso de cultivos de células GBM autólogas primarias, que se producen como se describe en este documento, como una fuente de antígeno para estudios de vacunas. Los cultivos de células primarios se establecen a partir de material obtenido en la cirugía. Los pacientes se someten a la atención estándar.

- 10 El paciente comienza la vacunación utilizando los cultivos de células primarios combinados con adyuvantes estimulantes inmunes. Las posibles adyuvantes para una vacuna de tumor incluyen células dendríticas, alumbre, GM-CSF, LPS, KLH etc., así como otros adyuvantes prometedores.

En algunos casos, el material de cGMP generado se utiliza directamente como antígeno tumoral para los donantes alogénicos. Los pacientes tienen sus tumores molecularmente coincidentes con la biblioteca correspondiente, se identifica un equivalente, y posteriormente se utiliza para el tratamiento.

- 15 Para identificar tratamientos contra el cáncer adicionales, los cultivos celulares producidos como se describe en este documento se seleccionan para la supresión del crecimiento celular mediado por fármacos, utilizando los compuestos de la colección clínica NIH. Esta colección representa fármacos utilizados en ensayos clínicos de fase temprana con perfiles de seguridad apropiada descrita y disponibilidad comercial. Los fármacos identificados como candidatos para la supresión de células se prueban in vivo en los mismos tumores en crecimiento en modelos de ratón deficientes inmunes. Del mismo modo, los fármacos identificados como candidatos son coincidentes con el perfil de transcripción o si las células del paciente están creciendo lo suficientemente rápido, los fármacos probados en el material del paciente y se utilizan en el paciente que permite la detección y el uso de fármacos específicos del paciente.

Ejemplo 7 - Estabilidad de lisados plaquetarios

- 25 Lisado plaquetario

- El lisado plaquetario fue fabricado como se describe en el Ejemplo 2. Inmediatamente después de la fabricación, PL se divide en alícuotas en múltiples viales y se transfieren a -70°C, 5°C, 25°C, o 37°C para el almacenamiento a largo plazo. Alícuotas suficientes fueron transferidas de tal manera que las muestras se mantuvieron a una sola temperatura hasta su análisis. Por lo tanto, los datos representan las muestras almacenadas a una temperatura constante durante el tiempo indicado. Tres lotes independientes de PL se analizaron para la presencia de factores de crecimiento y dos para la capacidad de proliferar MSC.

Métodos de análisis

- 35 Proliferación MSC: se obtuvieron células adultas mesenquimales del estroma (MSC), derivadas de tejido adiposo, de la grasa recogida como residuos procedentes de la cirugía gástrica de derivación. La grasa fue procesada, y MSC se expandieron y se congelaron hasta su uso en estos ensayos. Para estos ensayos, el MSC se descongelaron y se dejaron un solo pasaje antes de la siembra para el análisis. El crecimiento se determinó utilizando el Kit BioVision Quick Cell Proliferation Assay II (Mountain View, CA). Este ensayo se basa en la escisión de la sal de tetrazolio a formazina por deshidrogenasa mitocondrial celular. La cantidad de colorante escindido es proporcional a las células vivas. En resumen, MSC se sembraron a 1×10^4 células por pozo en RPMI1640 que contienen la cantidad designada de PL de las condiciones indicadas. Las células se incubaron durante 48 horas en incubadora humidificada a 37°C, 5% CO₂. Se adicionó el reactivo de detección (10 mL de WST) a cada pozo. La placa se incubó durante una hora, y el O.D. se midió según las instrucciones del fabricante.

- 45 Factores de crecimiento: Se utilizó una prueba de ELISA en PL que fue almacenado a las temperaturas indicadas para determinar la concentración de los factores de crecimiento de interés. Todos los ELISA fueron de R&D Systems (Minneapolis, MN) y se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

Resultados

- El crecimiento de MSC en PL siguió una curva de respuesta a la dosis típica. Se observó setenta por ciento de la capacidad de crecimiento de MSC utilizando 20% de la cantidad típica de PL como un suplemento. Por lo tanto, los medios suplementados con PL al 1% dieron lugar a aproximadamente 70% de la capacidad de crecimiento.
- 50 El almacenamiento a largo plazo del PL a 37°C redujo, pero no eliminó, el crecimiento de MSC (Figura 30). MSC se cultivaron con diferentes concentraciones de PL que habían sido mantenidas a -70°C o 37°C durante 48 días. Había una curva de respuesta a dosis típica observada tanto para PL incubada a -70°C y 37°C. De modo interesante, el PL incubado durante tanto tiempo a la temperatura corporal mantiene su capacidad de estimular el 70% del crecimiento esperado de PL a una concentración similar.

Para identificar los posibles cambios en las concentraciones de factores de crecimiento asociados con la reducción en el crecimiento de MSC, se midieron los niveles de FGF y PDGF en cuatro lotes de PL mantenidos a -70°C, 5°C, 25°C, y 37°C (Figuras 31 y 32). Estas concentraciones se midieron inmediatamente después de la producción, y en los días 7, 14, 21 y 48.

5 Cuando PL se almacenó a 37°C, durante 48 días, los niveles de FGF cayeron a 36.5 ± 5.8 pg/mL en comparación con los niveles de referencia de 115 ± 29.5 y 111.3 ± 26.8 cuando PL se almacenó durante 48 días a -70°C. Esta reducción fue significativa ($p < 0.01$ y una reducción de aproximadamente 32%; los datos representan la media de $N = 4$ lotes de PL, donde cada lote se midió utilizando tres muestras almacenadas de forma independiente). No se observó ninguna reducción en las concentraciones de FGF cuando se almacenó durante esta cantidad de tiempo a 5°C o 25°C.

10 De manera similar, cuando PL se almacenó a 37°C, durante 48 días, los niveles de PDGF corresponden a 2.8 ± 0.4 ng/mL en comparación con los niveles basales de 10.2 ± 1.8 o 10.1 ± 2.6 cuando PL se almacenó durante la misma cantidad de tiempo a -70°C. Esta reducción fue significativa ($p < 0.01$ y una reducción de aproximadamente 27%). Además, una reducción dependiente de la temperatura en la cantidad de PDGF medida cuando el PL se almacenó a 25°C (media = 6.0 ± 0.9 y $p = 0.02$) se observó. Por lo tanto, la pérdida en los factores de crecimiento se aproxima a la pérdida en la capacidad estimuladora del crecimiento de MSC. Para el cálculo de la vida útil, se utilizaron los cambios en los factores de crecimiento en el tiempo y la temperatura.

Estimación de la vida útil.

20 PDGF fue el más sensible a los efectos de envejecimiento acelerado. Por lo tanto, los resultados de vida útil se derivaron de estos datos (Figura 33). El método de intercepción de la pendiente (ecuación de Arrhenius), norma Q, y enfoques conservadores fueron utilizados para estimar la vida útil de los lisados plaquetarios (Figura 34 y Tabla 1).

Tabla 1. Vida útil estimada de los lisados plaquetarios.

	Para el almacenamiento a -70°C	Para el almacenamiento a -20°C
Vida útil	24.1 años	Aproximadamente 1 año (290.5 días)

25 En conjunto, estos resultados indican que las composiciones proporcionadas en este documento contienen contenidos plaquetarios tienen una vida útil estimada de más de cinco años a -70°C y una vida útil estimada de aproximadamente un año a -20°C.

Otras realizaciones

30 Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, la cual se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Ítems divulgados

1. Una composición de lisado plaquetario que comprende un filtrado de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de 0.45 μm o más pequeño.
- 35 2. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas es una preparación plaquetaria de aféresis lisada.
3. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicho filtro es un filtro de 0.45 μm .
4. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicho filtro es un filtro de 0.2 μm .
- 40 5. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicho filtrado proviene de dicha preparación plaquetaria lisadas que se pasa a través de un filtro de 0.45 μm y un filtro de 0.2 μm .
6. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas comprende sobrenadante de la centrifugación de plaquetas lisadas.
7. La composición de lisado plaquetario del ítem 6, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación.
- 45 8. La composición de lisado plaquetario del ítem 7, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante al menos dos ciclos de congelación/descongelación.

9. La composición de lisado plaquetario del ítem 6, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza entre 2000 x g y 4000 x g durante entre 15 y 45 minutos.
10. La composición de lisado plaquetario del ítem 6, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza de aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 30 minutos.
- 5 11. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dicha composición de lisado plaquetario comprende más de 200 pg de polipéptido VEGF por ml.
12. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde el cultivo de 1.4×10^6 células madre mesenquimales con medios que contienen aproximadamente el cinco por ciento de dicha composición de lisado plaquetario da como resultado más de 1.4×10^7 células después de tres días.
- 10 13. La composición de lisado plaquetario del ítem 1, en donde dichas células madre mesenquimales son células derivadas adiposas.
14. Una composición de lisado plaquetario producida filtrando una preparación plaquetaria lisadas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o más pequeño.
- 15 15. La composición de lisado plaquetario del ítem 14, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas es una preparación plaquetaria de aféresis lisada.
16. La composición de lisado plaquetario del ítem 14, en donde dicho filtro es un filtro de $0.45 \mu\text{m}$.
17. La composición de lisado plaquetario del ítem 14, en donde dicho filtro es un filtro de $0.2 \mu\text{m}$.
18. La composición de lisado plaquetario del ítem 14, en donde dicha composición de lisado plaquetario se produce filtrando dicha preparación plaquetaria lisadas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$.
- 20 19. La composición de lisado plaquetario del ítem 14, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas comprende sobrenadante de la centrifugación de plaquetas lisadas.
20. La composición de lisado plaquetario del ítem 19, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación.
- 25 21. La composición de lisado plaquetario del ítem 20, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante al menos dos ciclos de congelación/descongelación.
22. La composición de lisado plaquetario del ítem 19, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza entre 2000 x g y 4000 x g durante entre 15 y 45 minutos.
23. La composición de lisado plaquetario del ítem 19, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza de aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 30 minutos.
- 30 24. Un método para preparar una composición de lisado plaquetario, en donde dicho método comprende filtrar una preparación plaquetaria lisadas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ o más pequeño.
25. El método del ítem 24, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas es una preparación plaquetaria de aféresis lisada.
26. El método del ítem 24, en donde dicho filtro es un filtro de $0.45 \mu\text{m}$.
- 35 27. El método del ítem 24, en donde dicho filtro es un filtro de $0.2 \mu\text{m}$.
28. El método del ítem 24, en donde dicho método comprende filtrar dicha preparación plaquetaria lisadas a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ y un filtro de $0.2 \mu\text{m}$.
29. El método del ítem 24, en donde dicha preparación plaquetaria lisadas comprende sobrenadante de la centrifugación de plaquetas lisadas.
- 40 30. El método del ítem 29, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante un ciclo de congelación/descongelación.
31. El método del ítem 30, en donde dichas plaquetas lisadas son plaquetas lisadas mediante al menos dos ciclos de congelación/descongelación.
- 45 32. El método del ítem 29, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza entre 2000 x g y 4000 x g durante entre 15 y 45 minutos.

33. El método del ítem 29, en donde dicha centrifugación comprende una fuerza de aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 30 minutos.
34. Un método para preparar una composición de lisado plaquetario, en donde dicho método comprende:
- 5 (a) someter a lisis las plaquetas mediante uno o más ciclos de congelación/descongelación para obtener plaquetas lisadas,
- (b) centrifugar dichas plaquetas lisadas para obtener un sobrenadante, y
- (c) filtrar dicho sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm o más pequeño para obtener un filtrado, en donde dicho filtrado es dicha composición de lisado plaquetario.
- 10 35. El método del ítem 34, en donde dicha etapa de lisis comprende al menos dos ciclos de congelación/descongelación.
36. El método del ítem 34, en donde dicha etapa de centrifugación comprende usar una fuerza entre 2000 x g y 4000 x g durante entre 15 y 45 minutos.
37. El método del ítem 34, en donde dicha etapa de centrifugación comprende una fuerza de aproximadamente 3000 x g durante aproximadamente 30 minutos.
- 15 38. El método del ítem 34, en donde dicho filtro es un filtro de 0.45 µm.
39. El método del ítem 34, en donde dicho filtro es un filtro de 0.2 µm.
40. El método del ítem 34, en donde dicha etapa de filtración comprende filtrar dicho sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm y un filtro de 0.2 µm.
41. El método del ítem 34, en donde dichas plaquetas son plaquetas de aféresis.
- 20 42. Un método para expandir una población celular que comprende cultivar una primera población de células en presencia de un medio que comprende una composición de lisado plaquetario bajo condiciones en donde dicha primera población de células se expande a una segunda población de células que tiene más células que dicha primera población, en donde dicha composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisadas que se pasa a través de un filtro de 0.45 µm o más pequeño.
- 25 43. El método del ítem 42, en donde dichas células son células madre adultas, células tumorales primarias o células madre tumorales.
44. Un método para diferenciar células madre, en donde dicho método comprende cultivar dichas células madre en presencia de un medio diferenciador que comprende una composición de lisado plaquetario bajo condiciones en donde dichas células madre se diferencian, en donde dicha composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de 0.45 µm o más pequeño.
- 30 45. Un método para curar una herida, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha herida con una composición de lisado plaquetario, en donde dicha composición de lisado plaquetario comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisa pasada a través de un filtro de 0.45 µm o más pequeño.
46. El método del ítem 45, en donde dicha herida es un corte, una fístula o úlcera diabética.
- 35 47. El método del ítem 45, en donde dicha etapa de poner en contacto comprende usar una puntada o pegamento que comprende dicha composición de lisado plaquetario para poner en contacto dicha herida.
48. El método del ítem 45, en donde dicha etapa de poner en contacto comprende asperjar dicha composición de lisado plaquetario sobre dicha herida.
- 40 49. Una composición que contiene plasma y contenido de plaquetas a partir de una preparación plaquetaria pasada a través de un filtro de 0.45 µm o más pequeño.
50. La composición del ítem 49, en donde dicho plasma es plasma humano.
51. La composición del ítem 49, en donde dichos contenidos de plaquetas son contenidos de plaquetas humanas.
52. Una composición que comprende medio y un suplemento de cultivo de plasma plaquetario.
- 45 53. La composición del ítem 52, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas es un lisado plaquetario que comprende plasma.

54. La composición del ítem 52, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas es un filtrado obtenido al filtrar una preparación de aféresis de plaquetas que comprende plasma.
55. La composición del ítem 54, en donde dicha preparación de aféresis de plaquetas es una preparación de aféresis de plaquetas recolectada de un humano durante tres días antes.
- 5 56. La composición del ítem 54, en donde dicha preparación de aféresis de plaquetas es una preparación de aféresis de plaquetas recolectada de un humano durante cinco días antes.
57. La composición del ítem 54, en donde dicha preparación de aféresis de plaquetas es una preparación de aféresis de plaquetas recolectada de un humano durante seis días antes.
- 10 58. La composición del ítem 52, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas es un sobrenadante obtenido a partir de girar una preparación de aféresis de plaquetas que comprende plasma.
59. La composición del ítem 54, en donde dicha preparación de aféresis de plaquetas es una preparación de aféresis de plaquetas recolectada de un humano durante diez días antes.
60. Un método para obtener un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas que comprende eliminar plaquetas o restos de plaquetas de una preparación de aféresis de plaquetas de tal manera que al menos algo del plasma dentro de dicha preparación de aféresis de plaquetas se retiene, obteniendo de ese modo dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas comprende la capacidad de inducir la diferenciación de 1×10^6 células madre adultas en al menos 1×10^3 progenitores de cardiomiocitos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos, miocitos o células nerviosas dentro de los 60 días cuando se agrega al medio a una concentración del 5 por ciento como medio base con suplementación dirigida al tipo de célula deseado.
- 15 61. Un cultivo celular aislado que comprende células MCGBM103 cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas.
62. Un cultivo celular aislado que comprende células MCGBM106 cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas.
- 25 63. Un cultivo celular aislado que comprende células cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde dichas células crecen en dicho medio a una tasa que es más rápida que la tasa de las células de control cultivadas en medio de control que comprende 10 por ciento de suero fetal bovino.
64. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células y dichas células de control son células tumorales primarias.
- 30 65. El cultivo celular aislado del ítem 64, en donde dichas células y dichas células de control son células de glioma primario humano.
66. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células y dichas células de control son células madre.
67. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células y dichas células de control son células de fibroblastos.
- 35 68. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dicho medio y dicho medio de control son medio neurobasal o medio DMEM/F12.
69. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde 1×10^5 de dichas células crecen en dicho medio hasta más de 1×10^6 de dichas células más rápido de lo que 1×10^5 de dichas células de control cultivadas en dicho medio de control crecen hasta 1×10^6 de dichas células de control.
- 40 70. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde 1×10^5 de dichas células crecen en dicho medio a más de 3×10^7 de dichas células más rápido de lo que 1×10^5 de dichas células de control cultivadas en dicho medio de control crecen hasta 3×10^7 de dichas células de control.
71. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células son células de glioma primario, y en donde 5×10^5 de dichas células crecen en dicho medio hasta más de 1×10^7 de dichas células en 30 días.
- 45 72. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células son células de glioma primario, y en donde 5×10^5 de dichas células crecen en dicho medio hasta más de 1×10^7 de dichas células en 60 días.
73. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células son células madre, y en donde 1×10^5 de dichas células crecen en dicho medio hasta más de 1×10^7 de dichas células en 14 días.
74. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células son células madre, y en donde 1×10^5 de dichas células crecen en dicho medio hasta más de 1×10^7 de dichas células en 20 días.

75. El cultivo celular aislado del ítem 73 o 74, en donde dichas células madre son células madre mesenquimales.
76. El cultivo celular aislado del ítem 73 o 74, en donde dichas células madre son células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- 5 77. El cultivo celular aislado del ítem 63, en donde dichas células crecen en dicho medio a una tasa que es 1.5 veces más rápida que la tasa de dichas células de control cultivadas en dicho medio de control.
78. Un cultivo celular aislado que comprende células tumorales cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde dichas células crecen en dicho medio de una manera que es más estable genéticamente que cuando las células de control se cultivan en medio de control que comprende 10 por ciento de suero fetal bovino.
- 10 79. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células tumorales y dichas células de control son células tumorales primarias.
80. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células tumorales y dichas células de control son células de glioma primario humano.
- 15 81. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dicho medio y dicho medio de control son medio neurobasal o medio DMEM/F12.
82. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante cuatro duplicaciones exhiben menos de un cinco por ciento de cambio en el cariotipo en comparación con dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
- 20 83. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante cuatro duplicaciones exhiben menos de un cambio del tres por ciento en el cariotipo en comparación con dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
84. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante diez duplicaciones exhiben menos de un cambio de cinco por ciento en el cariotipo en comparación con dichas células tumorales cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
- 25 85. Un cultivo celular aislado que comprende células madre cultivadas en medio que comprende un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde dichas células madre crecen en dicho medio de una manera que es más estable genéticamente que cuando las células madre de control se cultivan en medio de control que comprende 10 por ciento de suero bovino fetal.
- 30 86. El cultivo celular aislado del ítem 85, en donde dichas células madre y dichas células madre de control son células madre mesenquimales.
87. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células madre y dichas células madre de control son células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
88. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dicho medio y dicho medio de control son medio neurobasal o medio DMEM/F12.
- 35 89. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células madre cultivadas en dicho medio durante cuatro duplicaciones exhiben menos de un cinco por ciento de cambio en el cariotipo en comparación con dichas células madre cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
90. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células madre cultivadas en dicho medio durante cuatro duplicaciones exhiben menos de un cambio del tres por ciento en el cariotipo en comparación con dichas células madre cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
- 40 91. El cultivo celular aislado del ítem 78, en donde dichas células madre cultivadas en dicho medio durante diez duplicaciones exhiben menos de un cinco por ciento de cambio en el cariotipo en comparación con dichas células madre cultivadas en dicho medio durante una duplicación.
- 45 92. Un método para obtener un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas que comprende la eliminación de plaquetas o restos de plaquetas de una preparación de aféresis de plaquetas de tal manera que al menos algo del plasma dentro de dicha preparación de aféresis de plaquetas se retiene, obteniendo de ese modo dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas comprende la capacidad de inducir la proliferación de menos de 1×10^6 células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el paso cinco en al menos 1×10^8 células dentro de 20 días cuando se agrega a un medio esencial mínimo a una
- 50 concentración del 5 por ciento.

93. El método del ítem 92, en donde dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas comprende la capacidad de inducir la proliferación de menos de 1×10^6 células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el paso cinco en al menos 1×10^8 células dentro de los 15 días cuando se agrega a medio esencial mínimo en una concentración del 5 por ciento.
- 5 94. Un método para obtener un suplemento de cultivo de plasma de plaquetas que comprende eliminar plaquetas o restos de plaquetas de una preparación de aféresis de plaquetas de tal manera que al menos algo del plasma dentro de dicha preparación de aféresis de plaquetas se retiene, obteniendo de ese modo dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas, en donde el medio esencial mínimo que tiene 5 por ciento de dicho suplemento de cultivo de plasma de plaquetas es capaz de establecer, a partir del tejido de biopsia multiforme de glioblastoma humano recién diagnosticado, cultivos de glioma humano que tienen más de 3×10^7 células en 60 días a 37°C con una tasa de éxito que es mayor del 30 por ciento .
- 10 95. El método del ítem 94, en donde dicha tasa de éxito es superior al 40 por ciento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de lisado plaquetario que comprende un filtrado a partir de una preparación plaquetaria lisada pasada a través de un filtro de 0.45 μm y/o 0.2 μm para uso en la curación de heridas, en donde dicho filtrado comprende más de 200 pg de polipéptido VEGF por ml.
- 5 2. La composición de lisado plaquetario para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es un aerosol, pegamento o una sutura.
3. La composición de lisado plaquetario para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la herida es una úlcera diabética, una fístula o un corte.
- 10 4. La composición de lisado plaquetario para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición comprende además heparina.

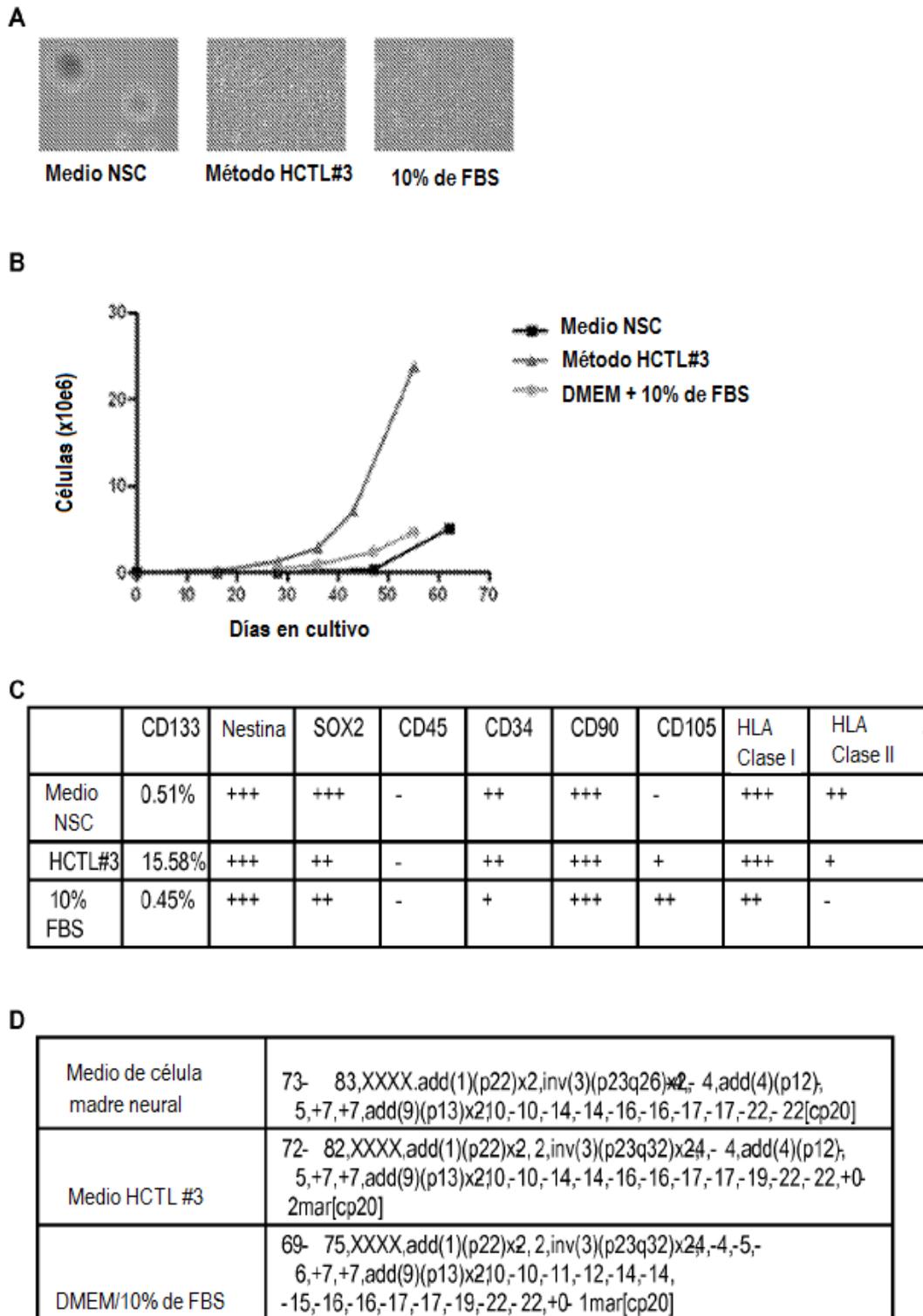


FIG. 1

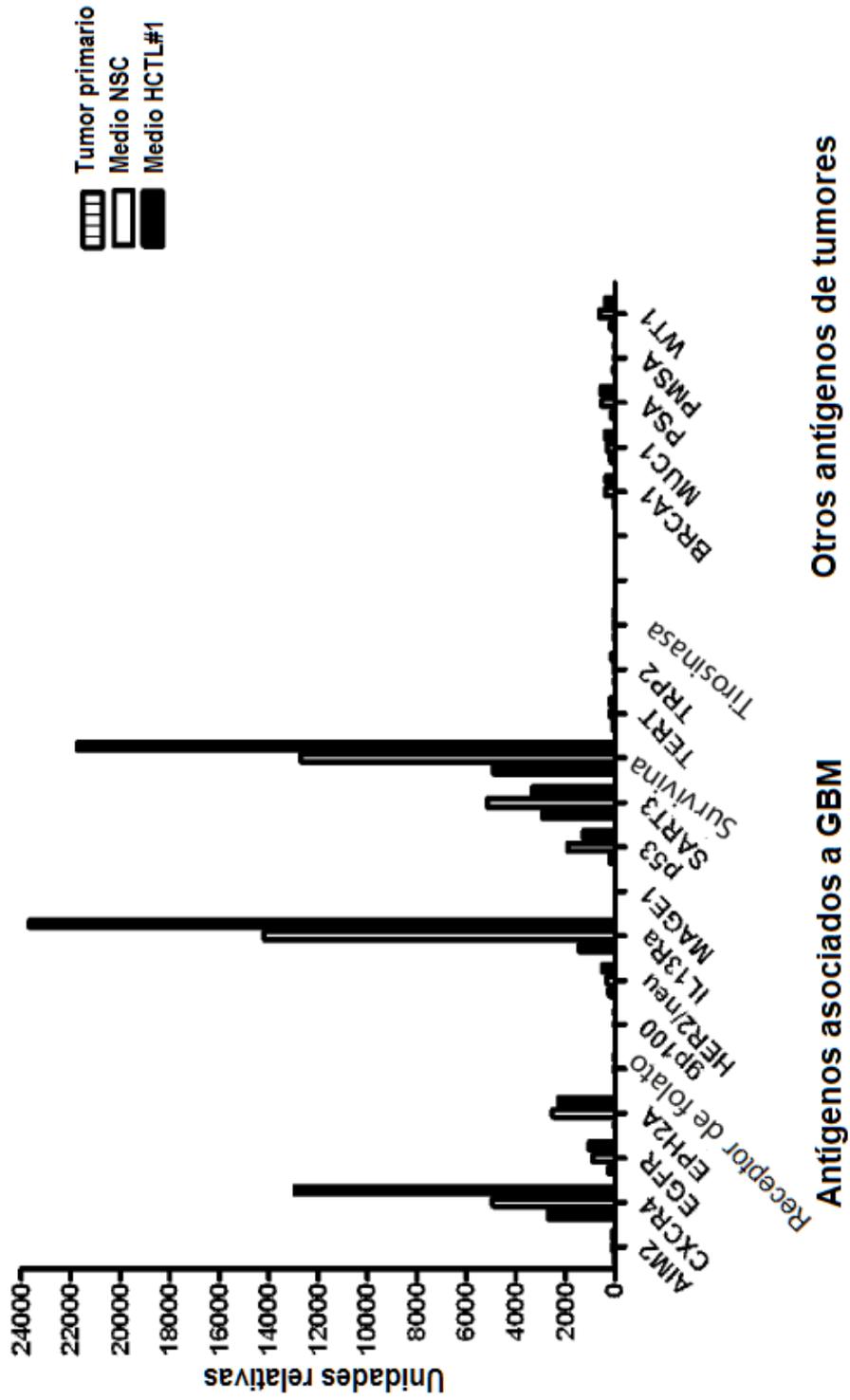


FIG. 2

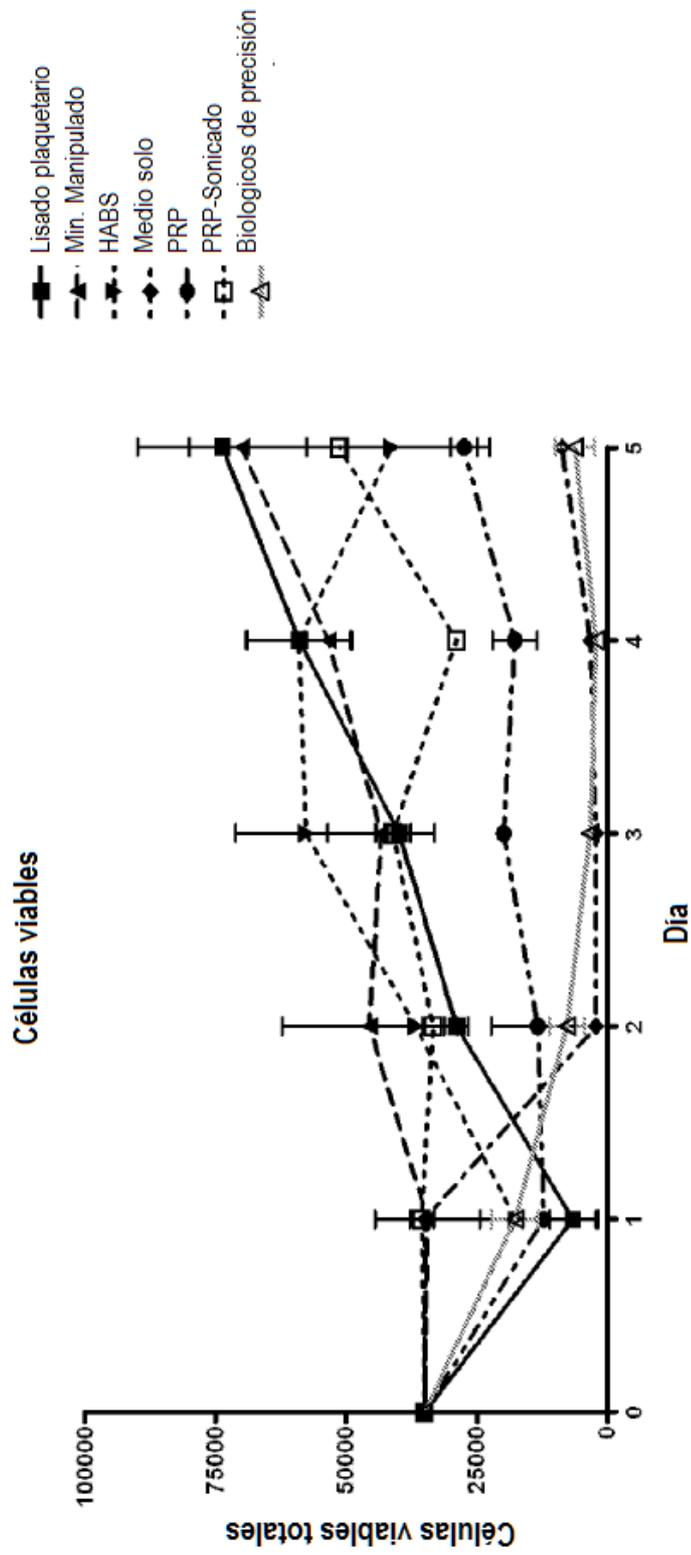


FIG. 3

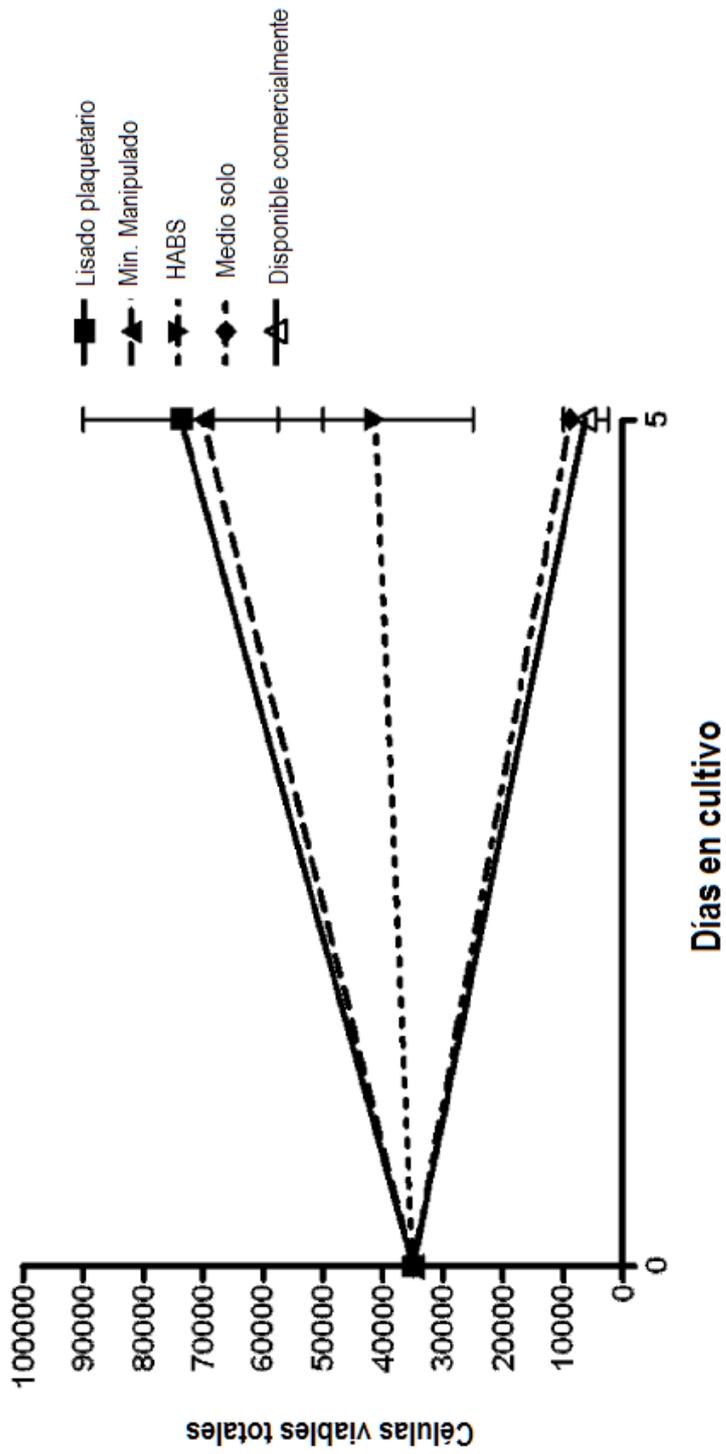


FIG. 4

Cinética del crecimiento de MSC

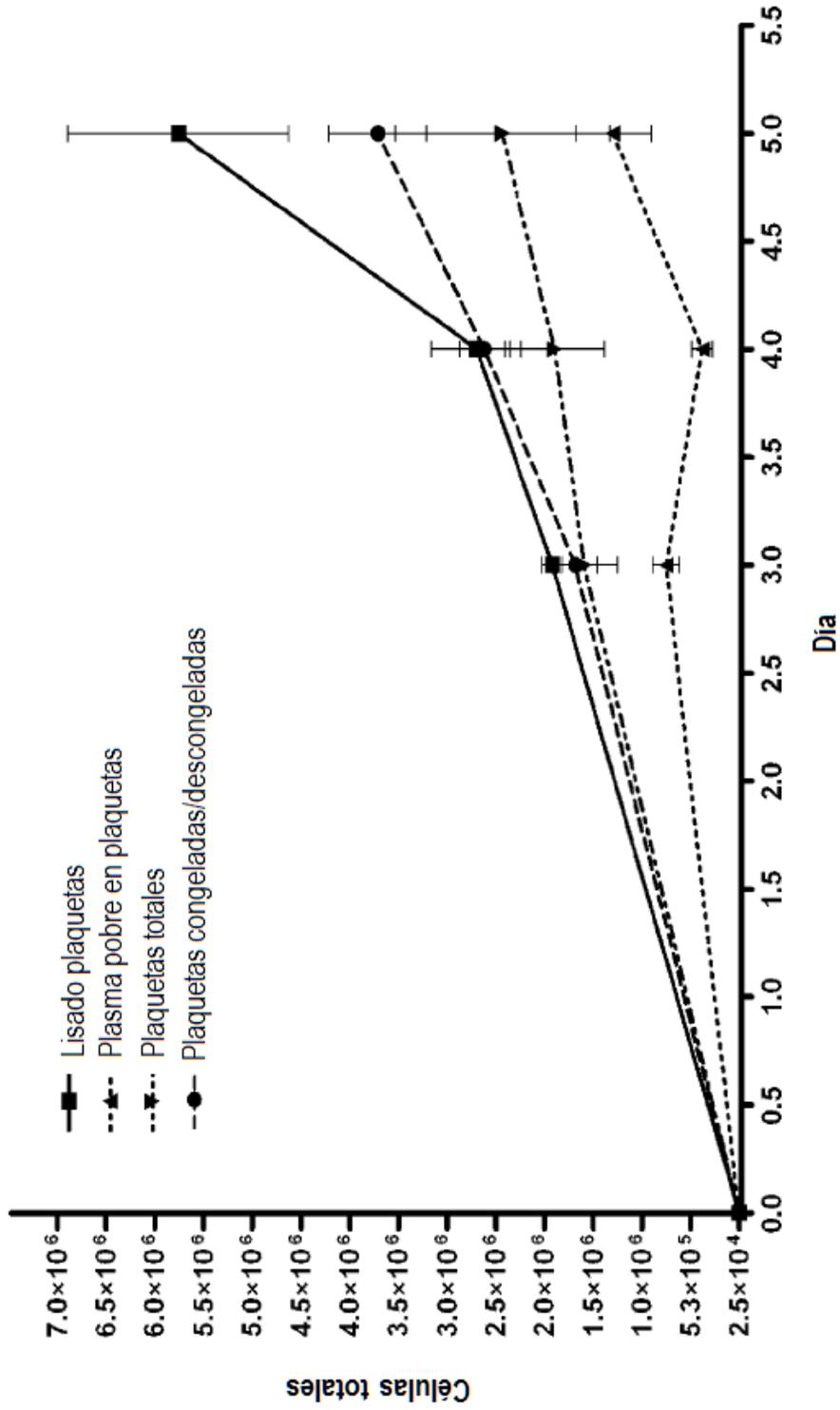


FIG. 5

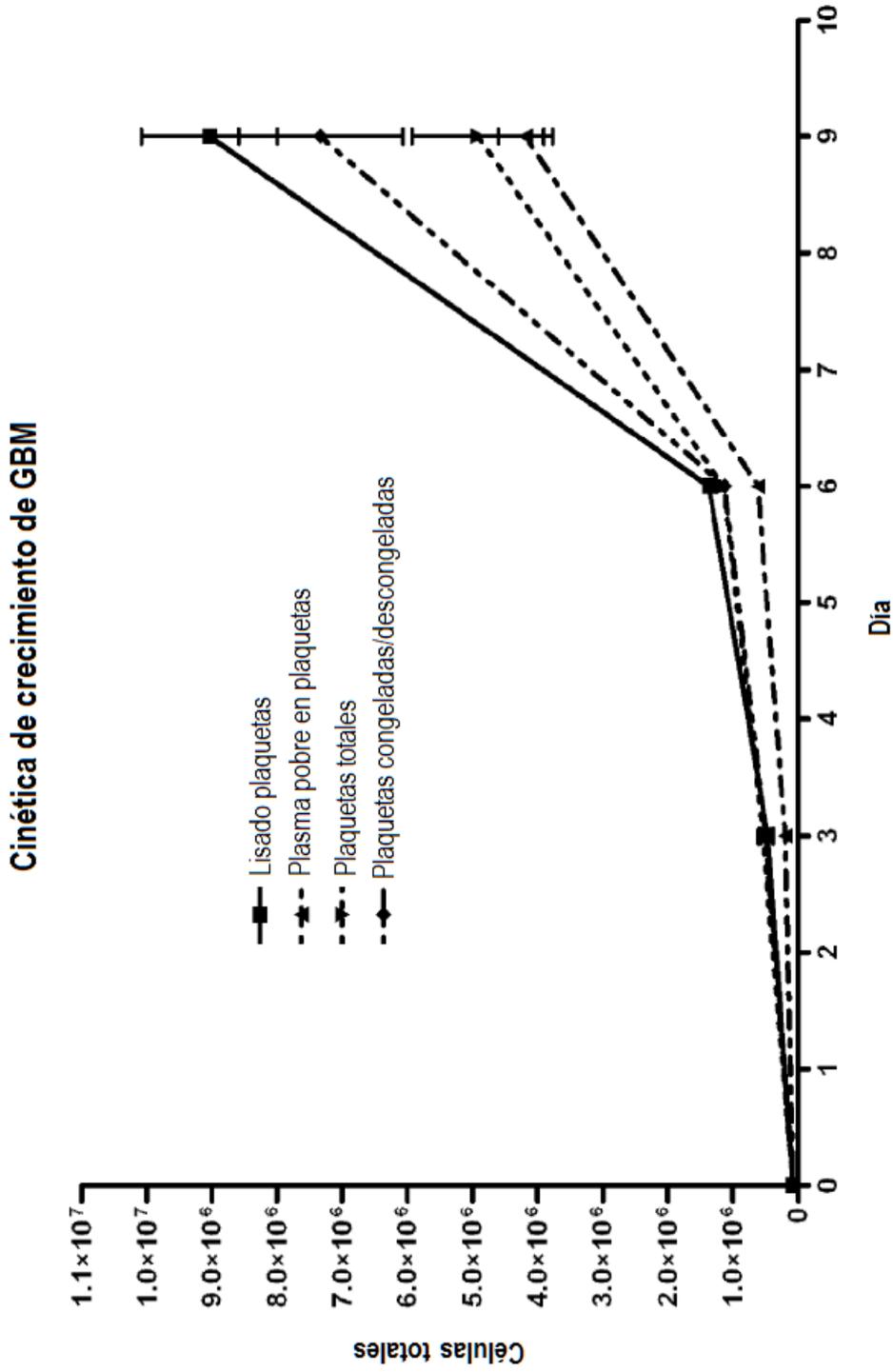


FIG. 6

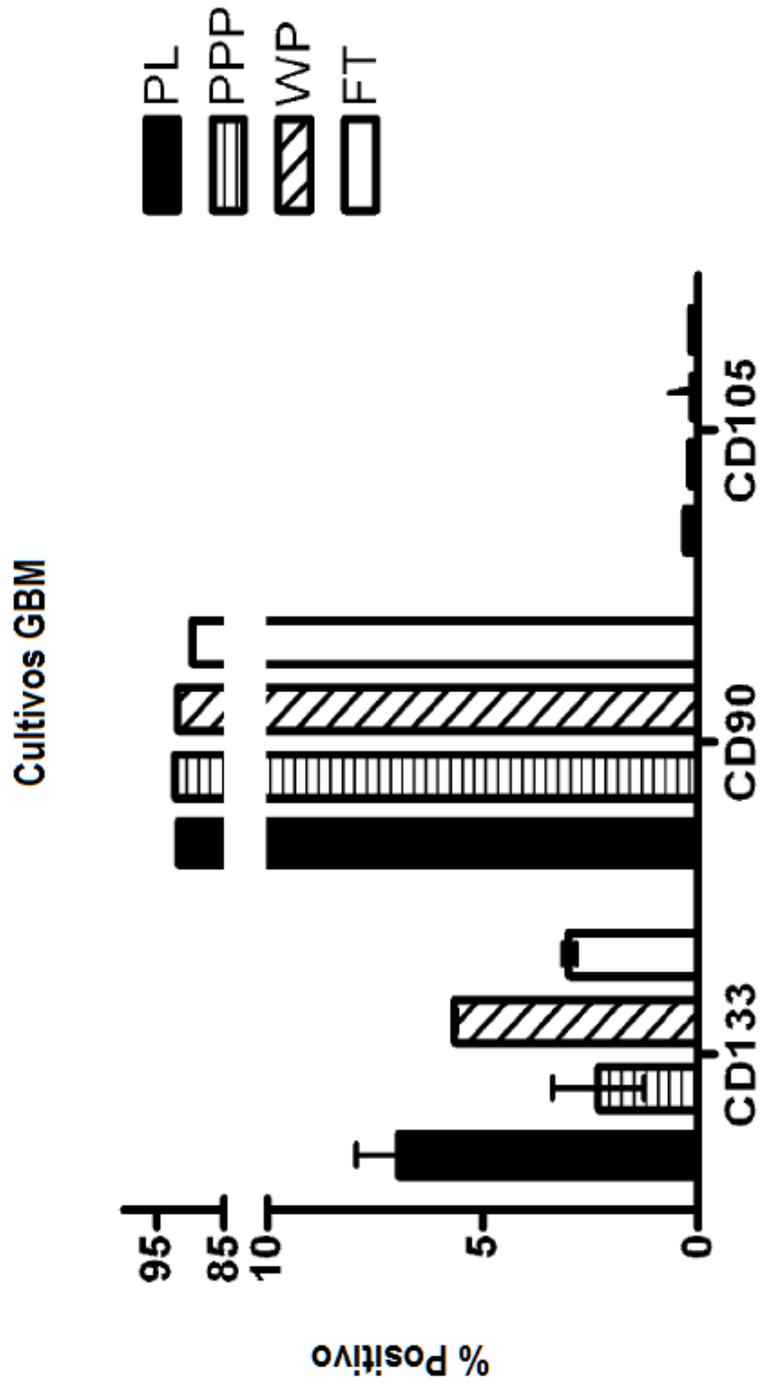


FIG. 7

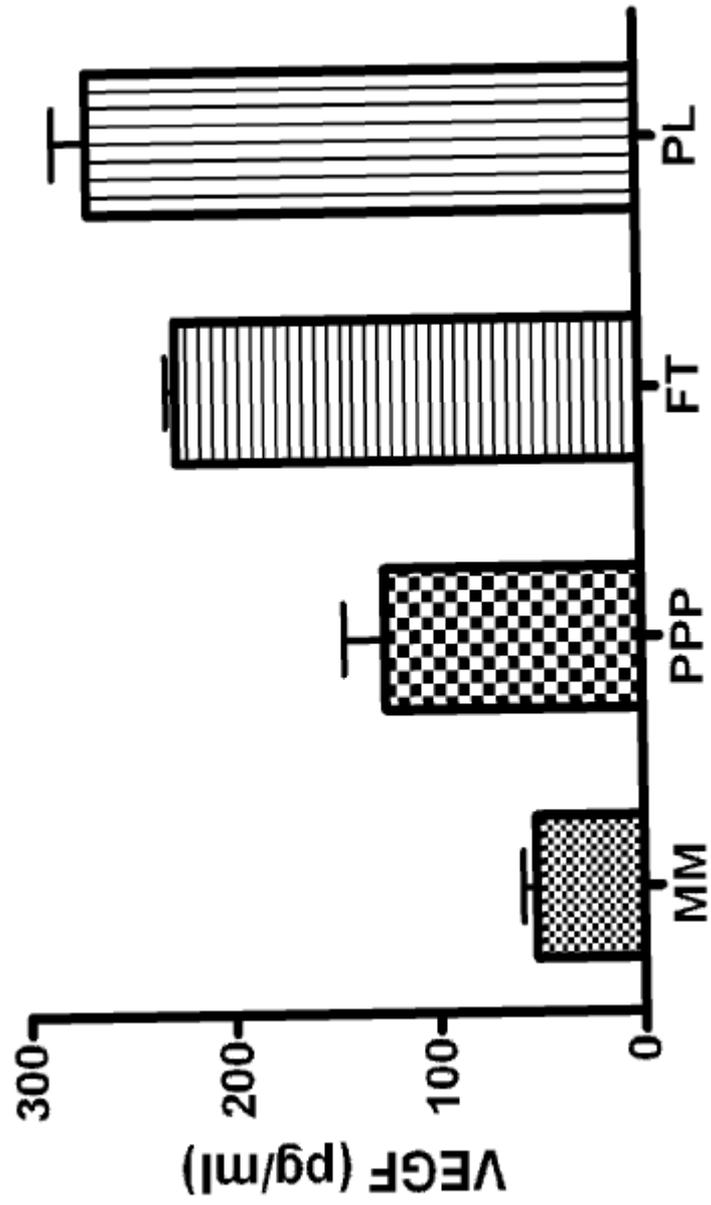


FIG. 8

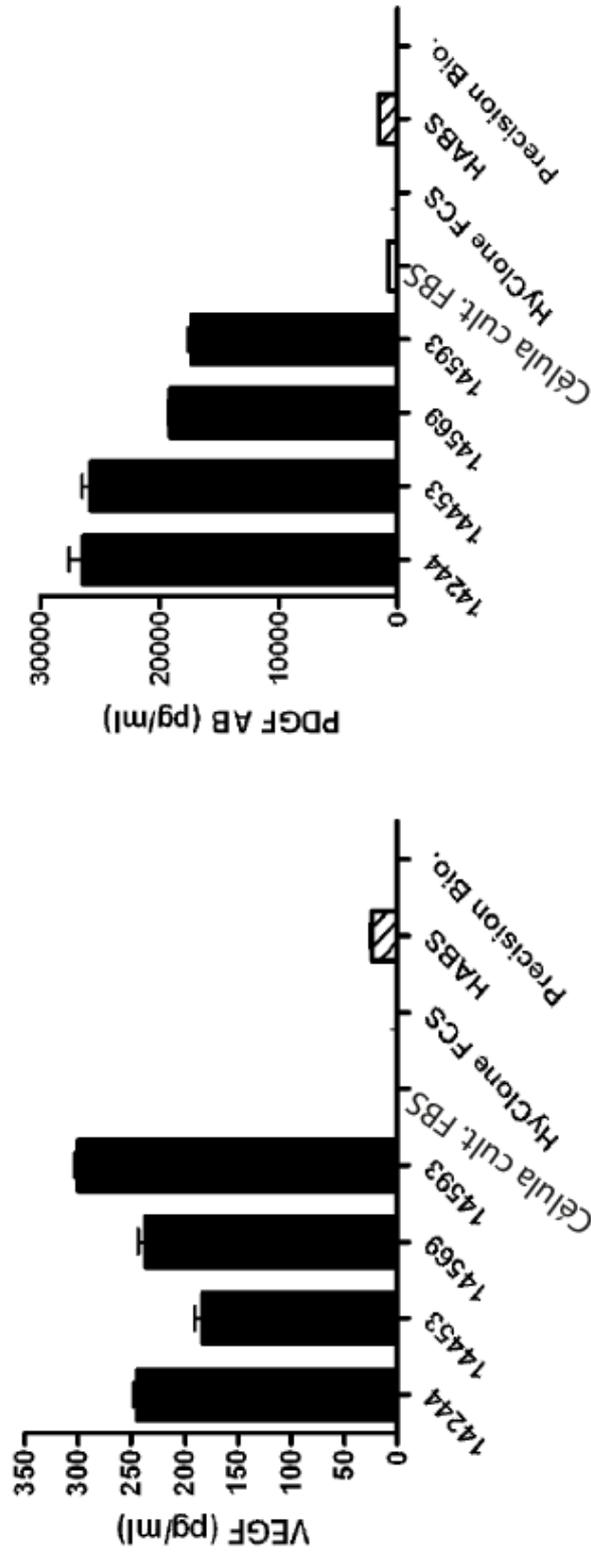


FIG. 9

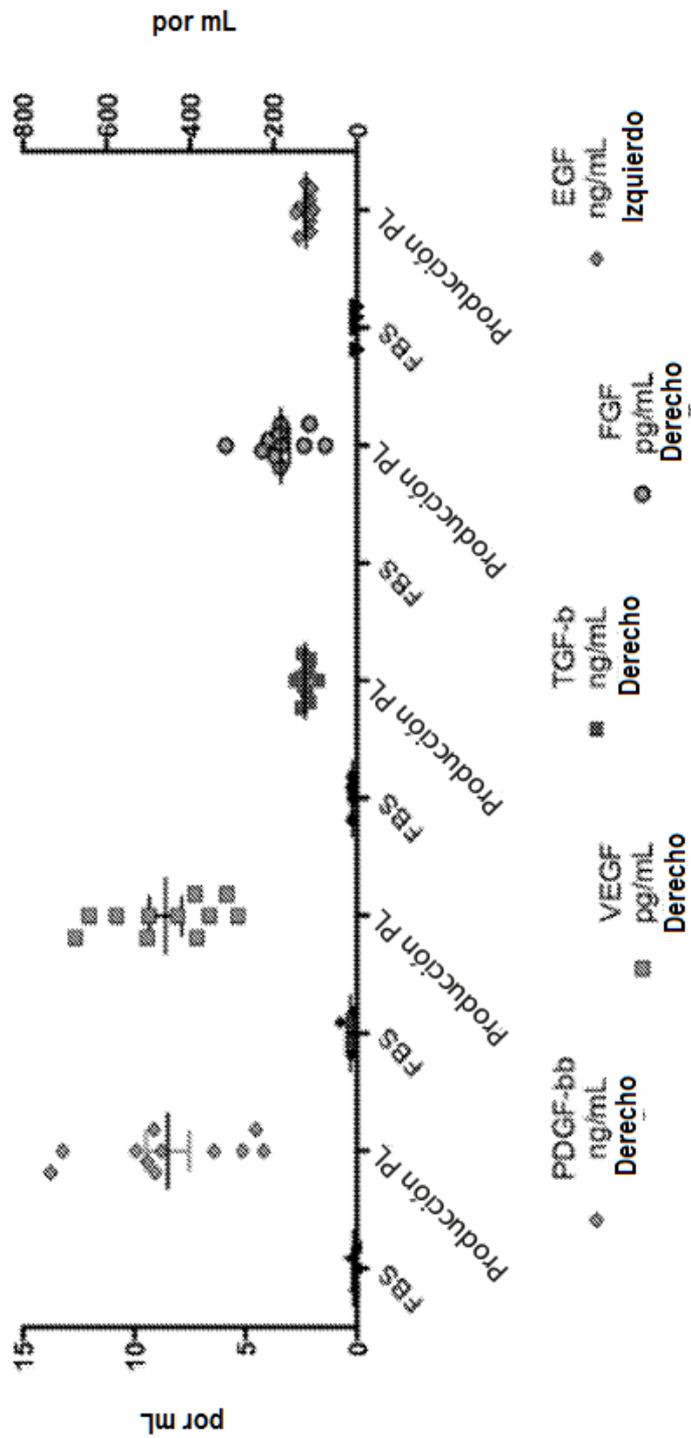


FIG. 10

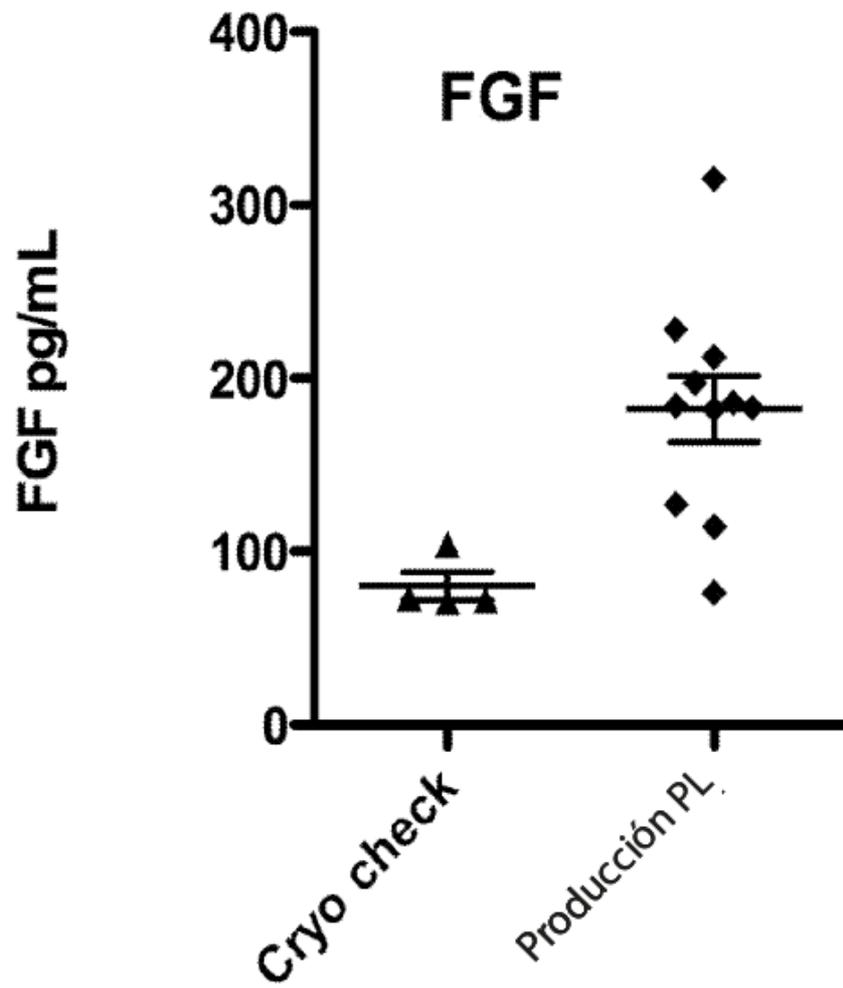


FIG. 11

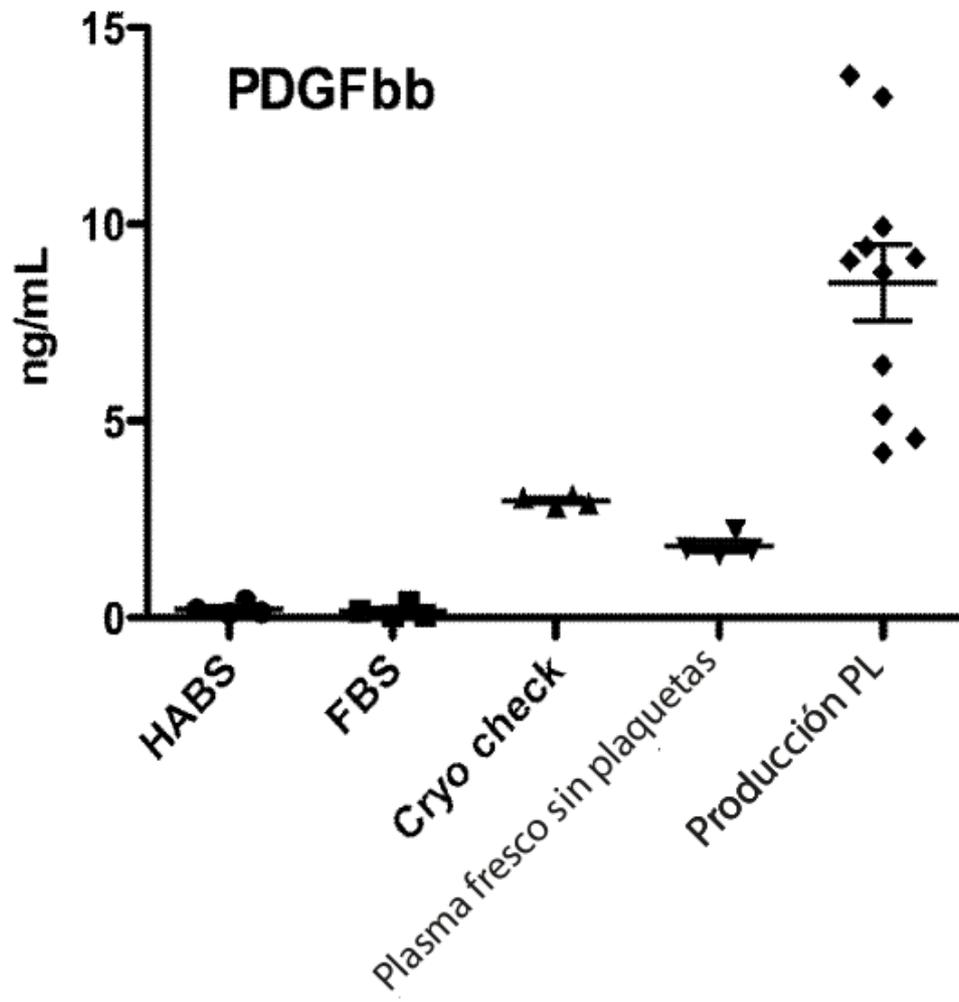


FIG. 12

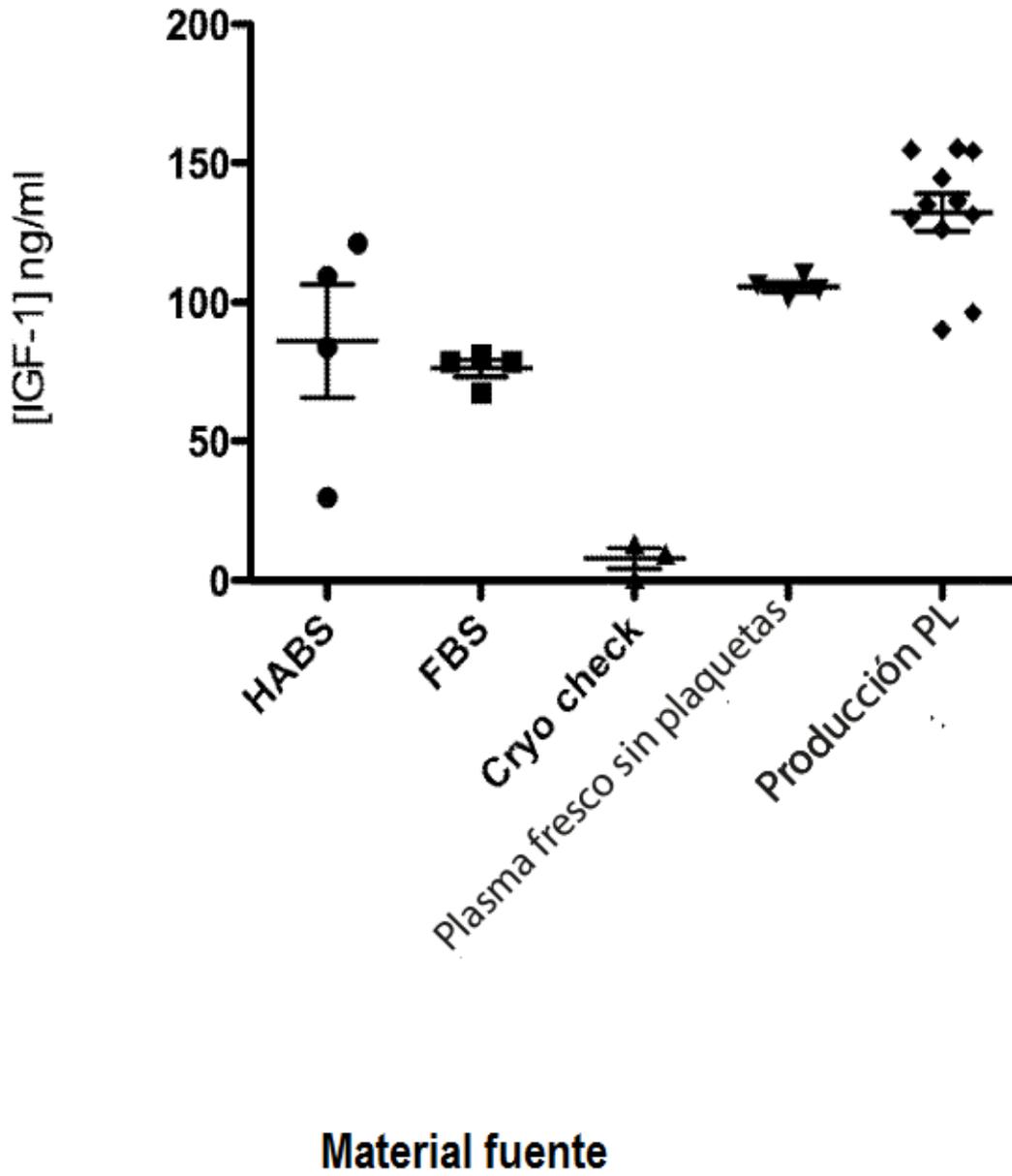


FIG. 13

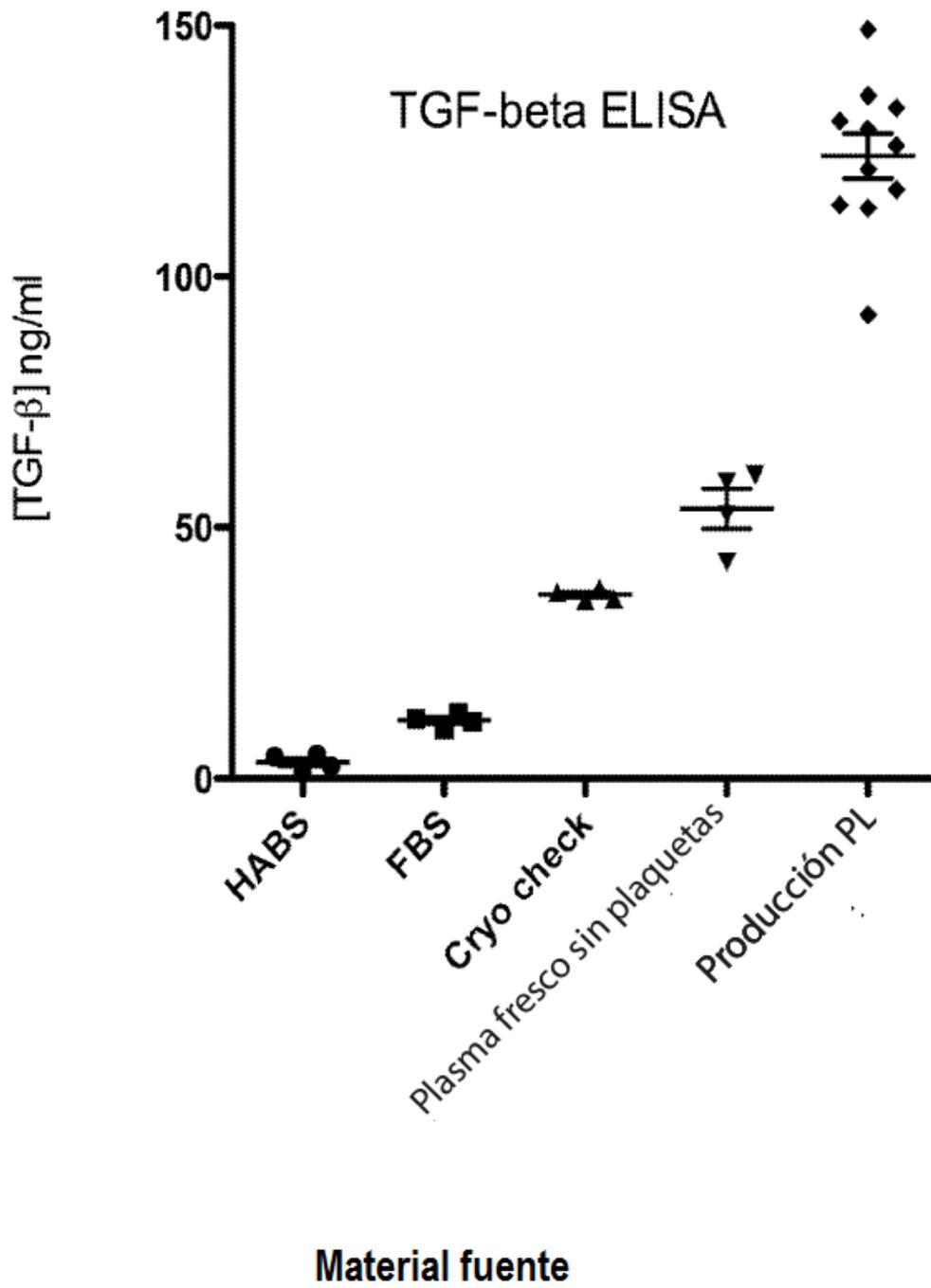
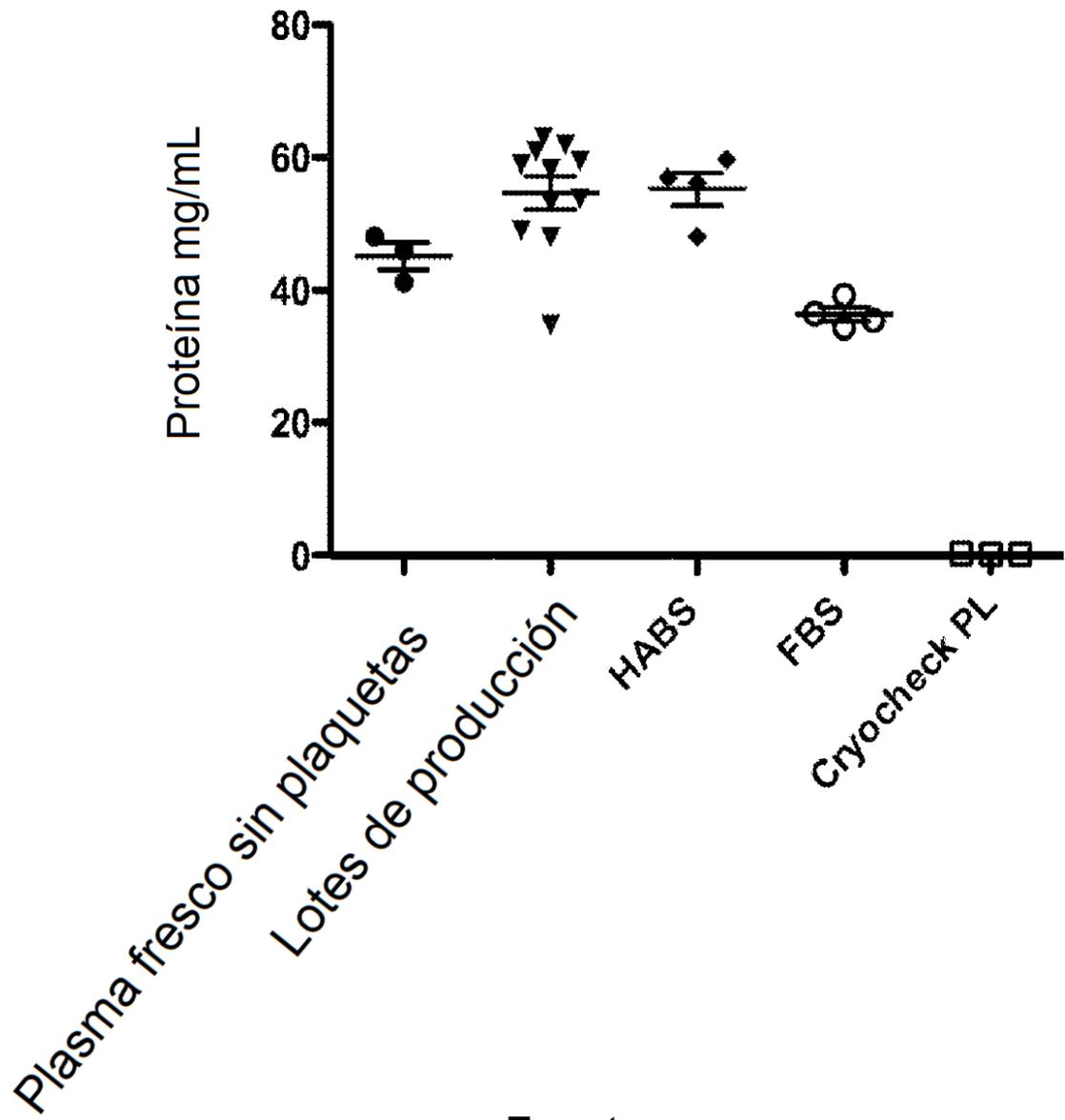


FIG. 14



Fuente

FIG. 15

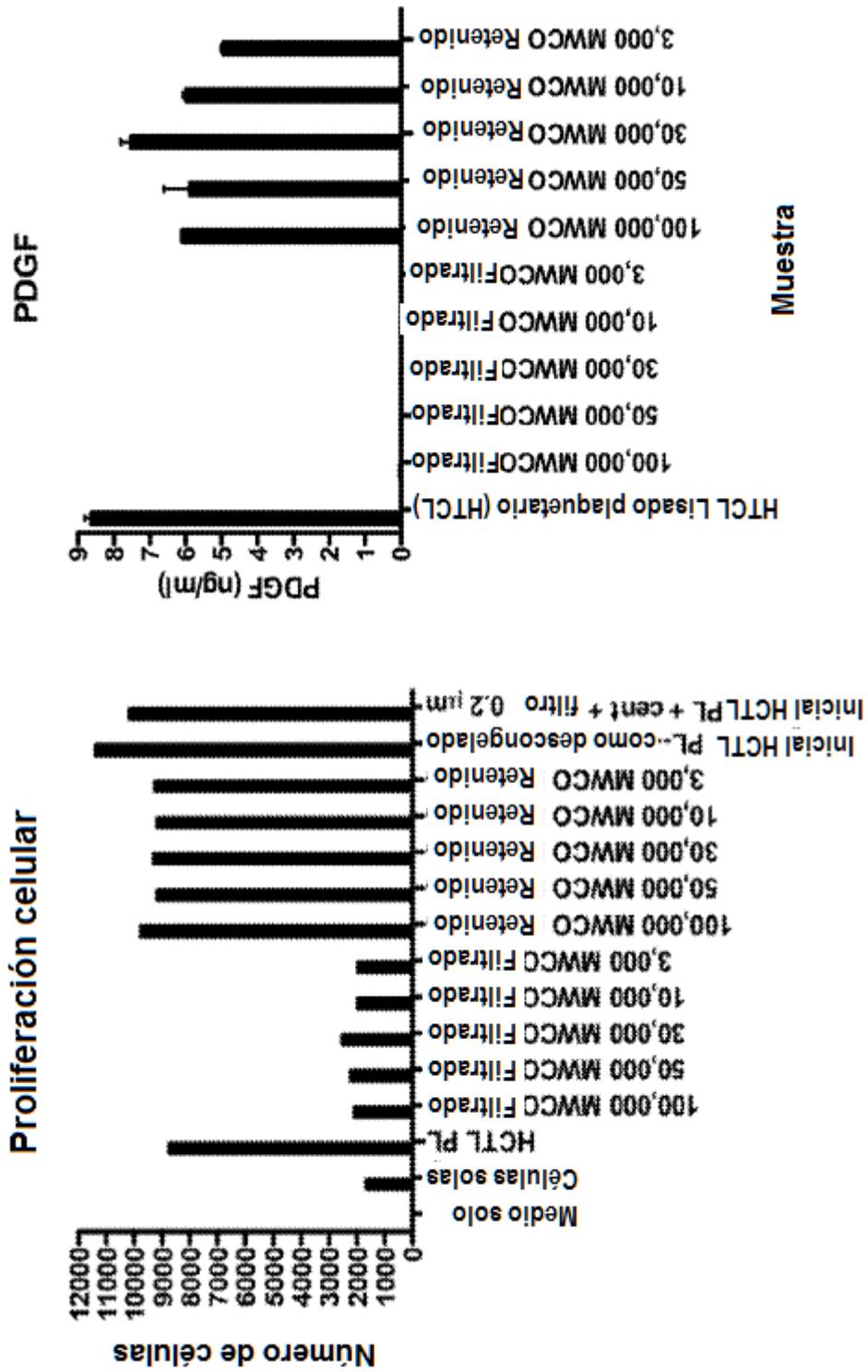


FIG. 16

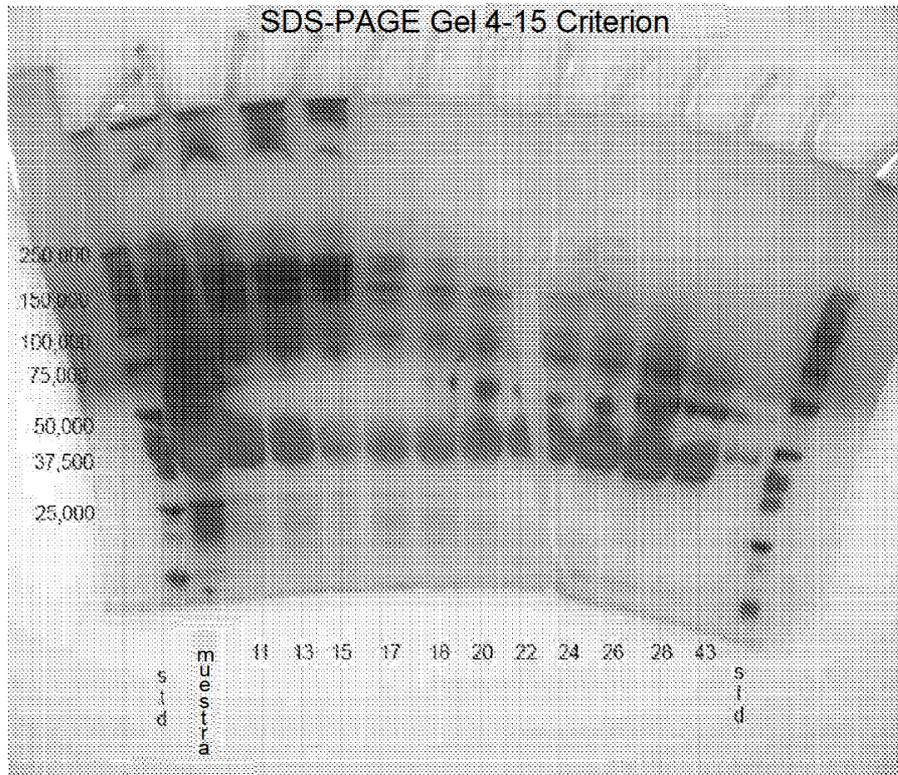
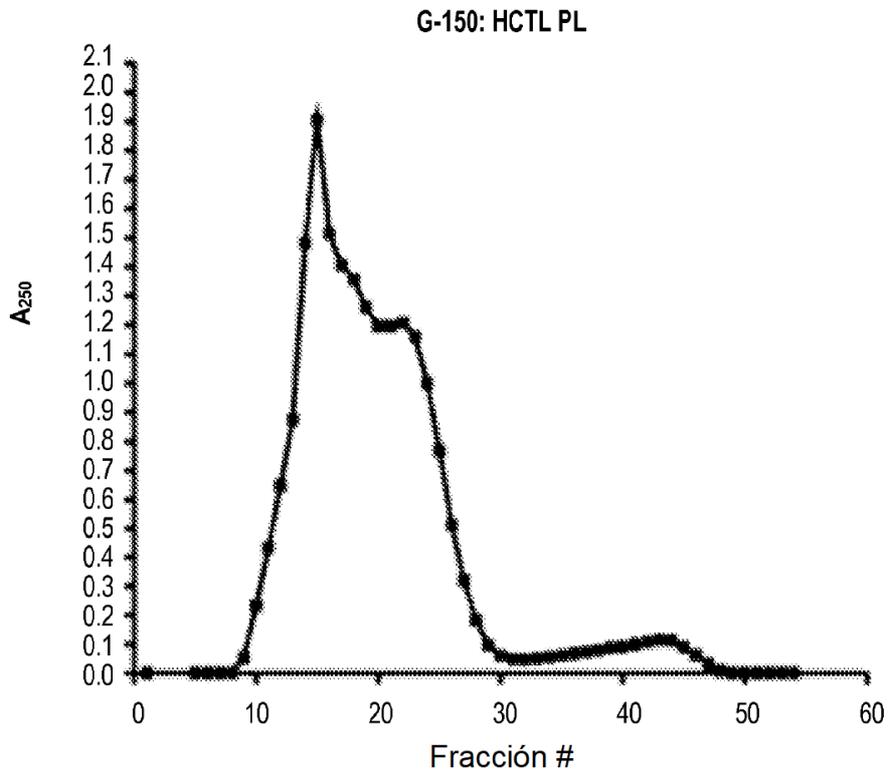


FIG. 17

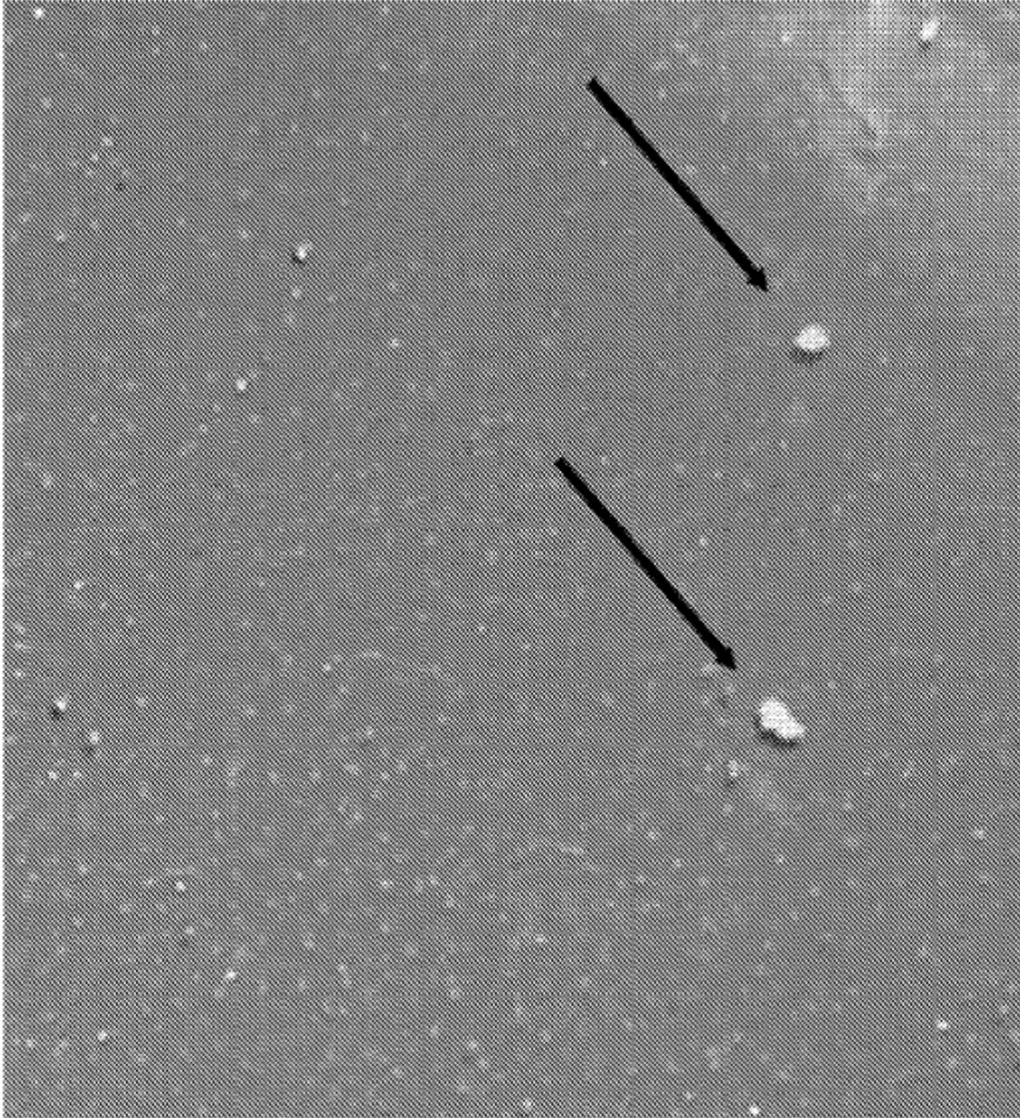
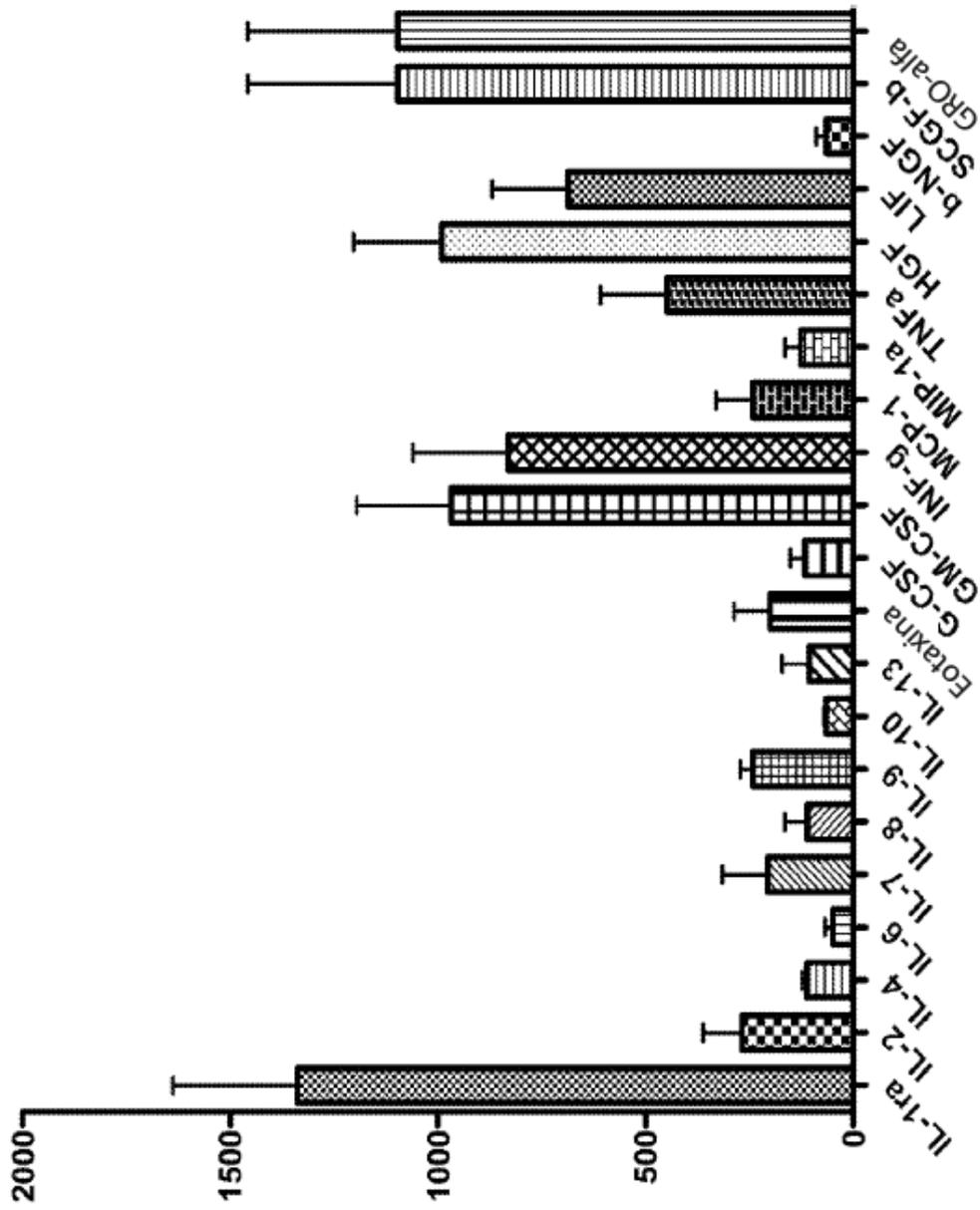
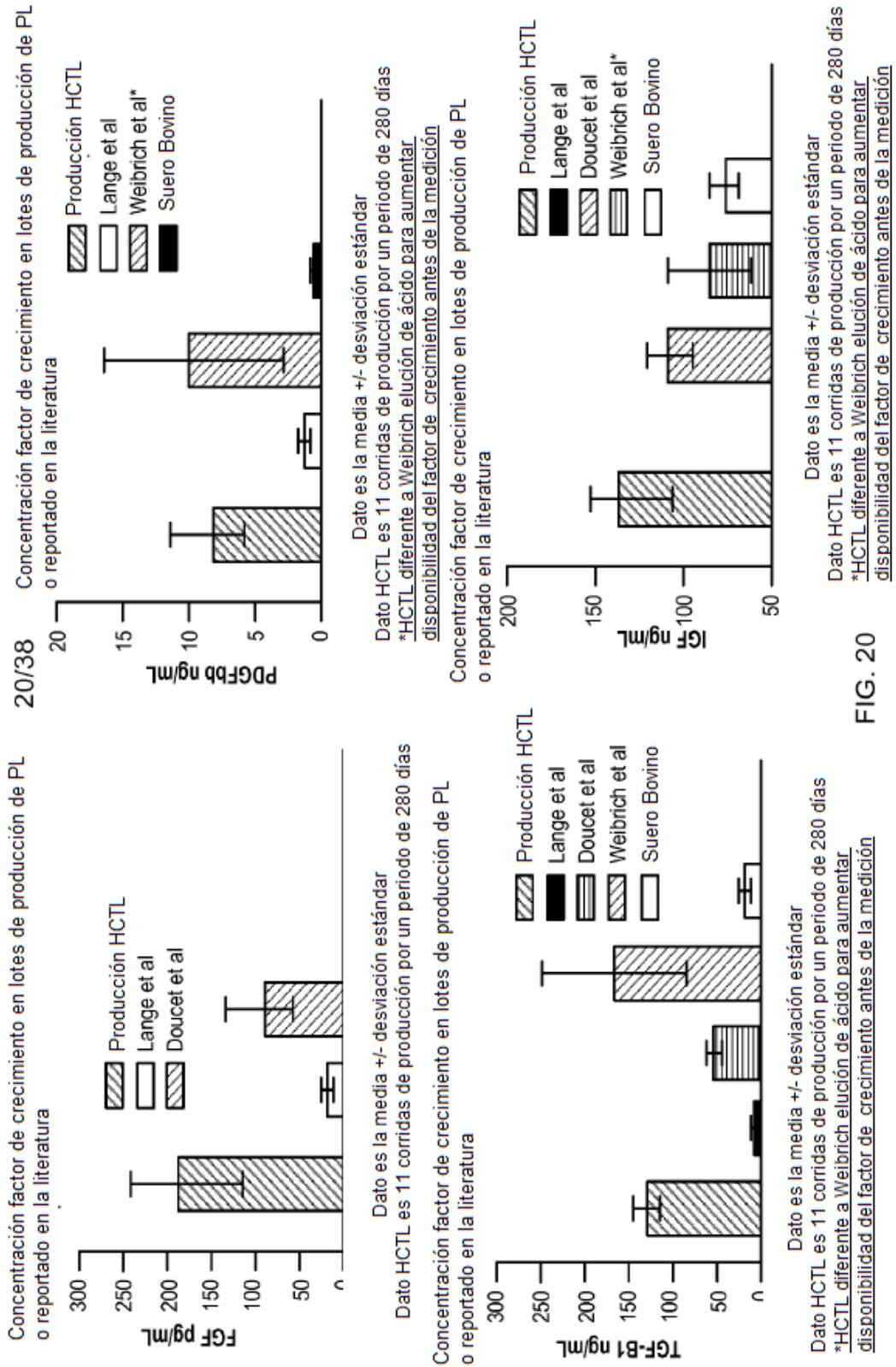


FIG. 18



Citoquina/factor de crecimiento

FIG. 19



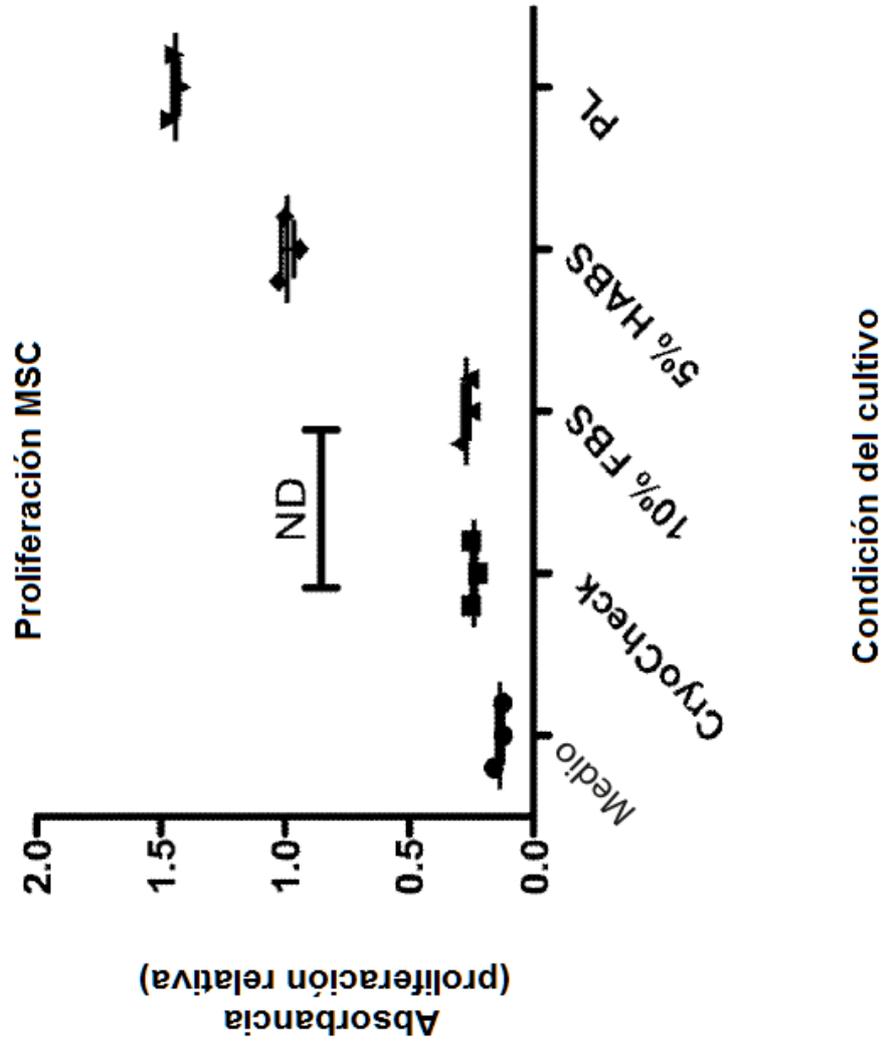
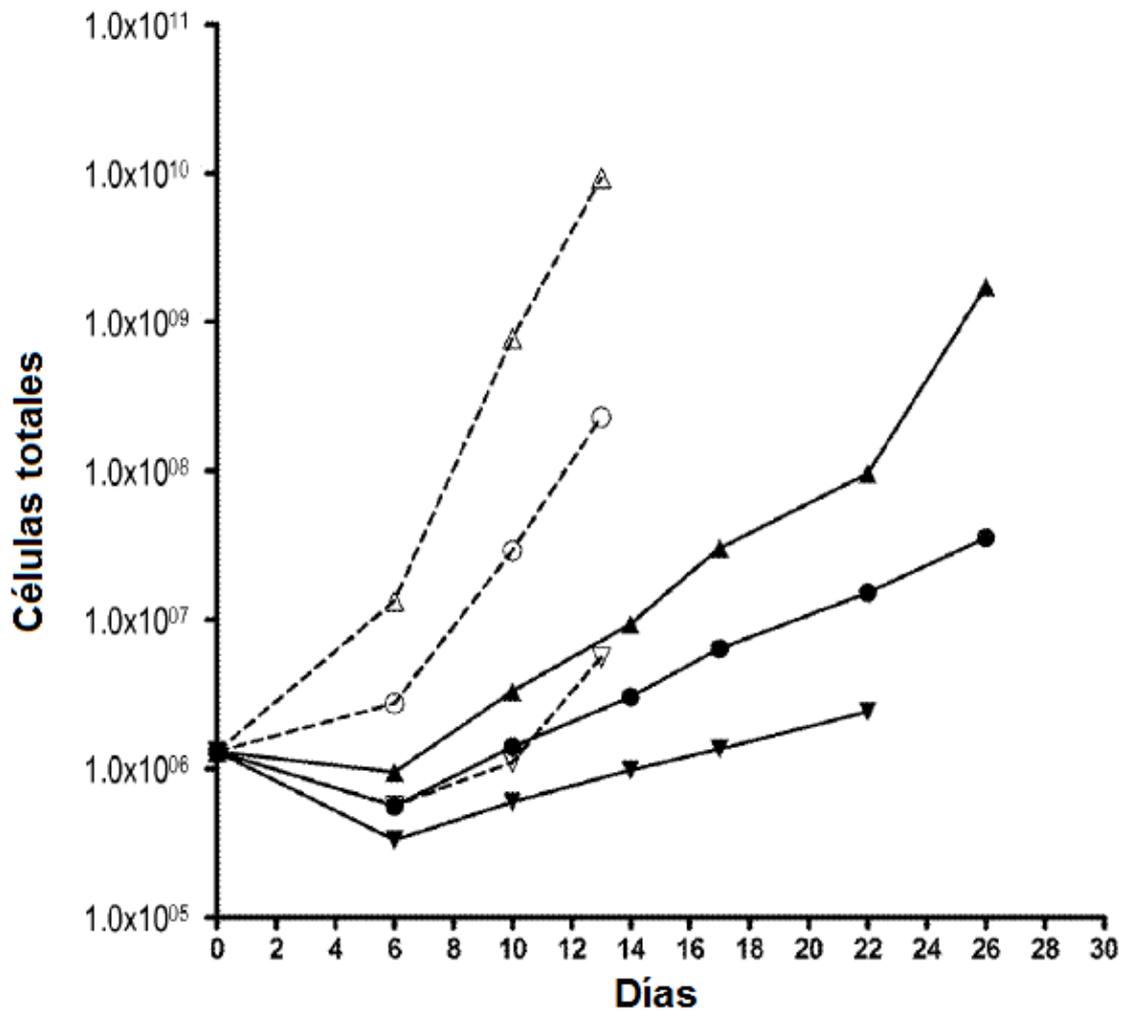
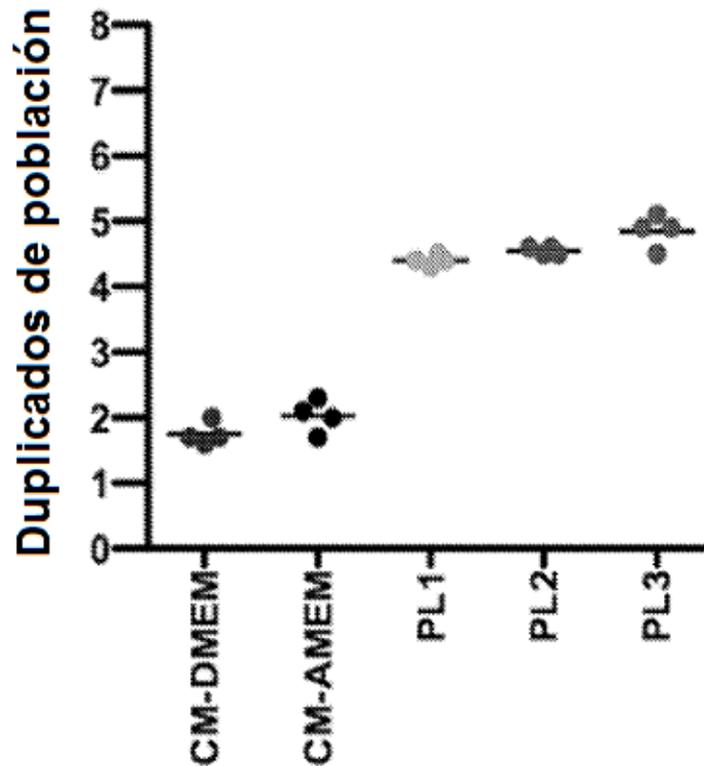


FIG. 21



MSC derivadas de grasa crecieron más rápido en PL-5% que CM. La tasas de crecimiento calculada (línea punteada) vs. CM (línea sólida). MSC derivadas de tejido adiposo normal y cultivo en PL-5% o CM. Los triángulos representan intervalo de confianza de 95% calculado.

FIG. 22



MSC a partir de tejido adiposo se aislaron, cultivaron en medio completo, CM (10% de FCS +DMSM) durante dos días luego se congelan. Después de descongelar las MSC se cultivaron en CM-DMEM, o 10% de FCS-AMEM (CM-AMEM) o AMEM suplementado con uno de tres lotes de lisado plaquetario.

Los datos representan el número de duplicados de población durante el segundo pasaje de una densidad baja de siembra.

FIG. 23

Tumor	Tamaño	Condiciones 30x106/60 días		CD133%	Citogenética
GBM2617-05	1.7	NSC/PL	N/N	21.2/0.12	
GBM2617-06	?2	NSC/PL	Y/Y	30/1	AB/AB
GBM083007	?1	NSC/PL/FBS	N/Y/N	0.5/15.6/0.5	AB/AB/AB
GBM091207	?1	NSC/PL/FBS	N/Y/N	3.3/38/2.3	AB/AB/AB
GBM2617-07	2.4	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	ND
GBM2617-11	1.5	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	AB
GBM2617-12	4.2	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	
GBM101	2.1	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	ND
GBM102	2.2	NSC/PL/FBS	Y/N/N	ND	ND
GBM103 CUSA	2.7	NSC/PL/FBS	N/Y/N	<1% each	AB/AB/AB
GBM106	2.2	NSC/PL/FBS	N/Y/N	14.1/.33/0	AB/AB/AB
GBM108	0.9	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND/4.0/0	AB/AB/AB
GBM109 CUSA	3.2	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	ND
GBM110	0.4	NSC/PL/FBS	N/Y/N	14.8/0.2	(TBD)
GBM111 CUSA	3.0	NSC/PL/FBS	N/Y/N	5.3/4.7/0	AB/AB/AB
GBM112	1.2	NSC/PL/FBS	N/N/N	ND	ND

HCTL 7/16 criterios de vacuna apropiados = 44%

NSC 2/16 criterios de vacuna apropiados = 13%

FBS 0/15 criterios de vacuna apropiados = 0%

Una de dos líneas celulares adicionales crecen en PL (2617-05 y GBM108) pero no cumplieron con los criterios.

Tejido se corta esencialmente en cuatro partes, 1 para el ARN y 3 para las condiciones de cultivo

Observaciones generales

NSC: neuroesferas, una pareja de semiadherentes

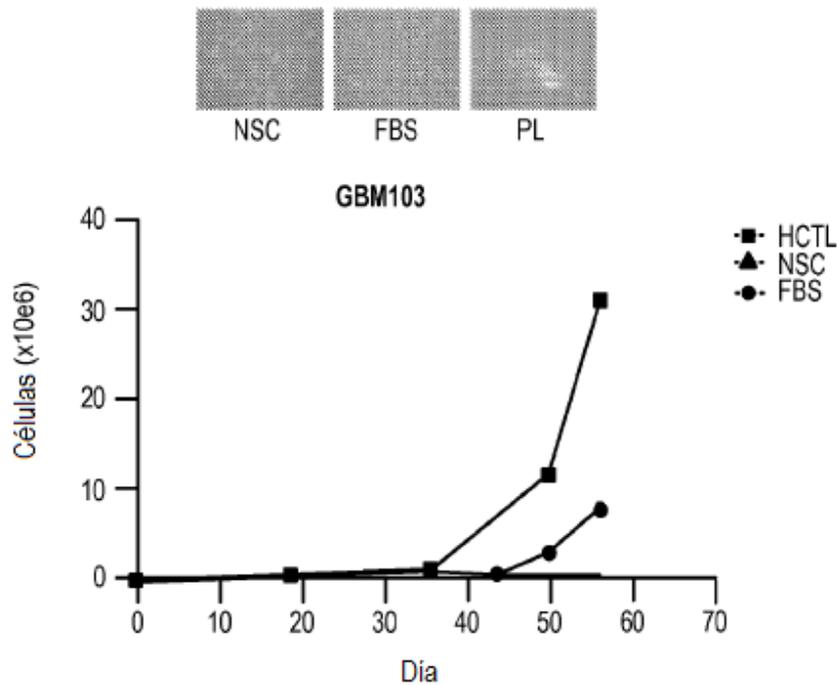
PL: monocapa y semiadherente, 1 neuroesfera

FBS: monocapa

Análisis fenotípico general

CD90+/CD45-/CD34LO/HLA ABC+/HLA DR-

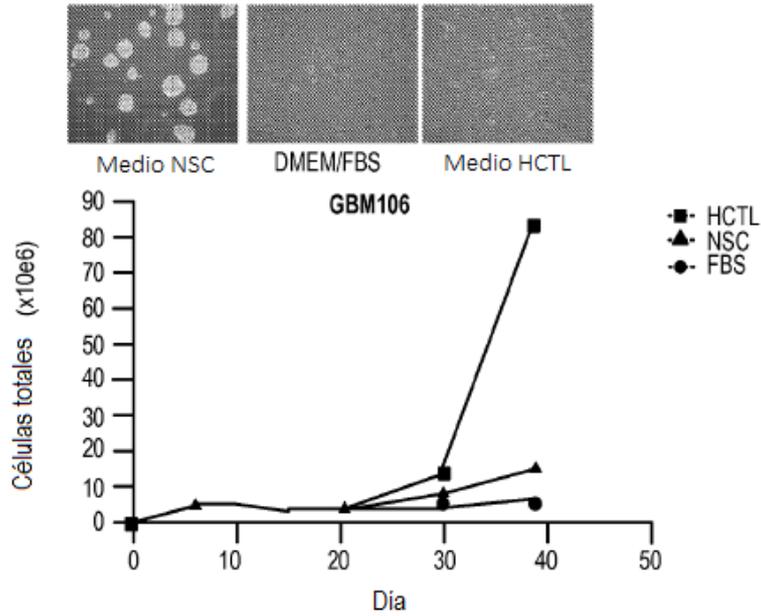
FIG. 24A



GBM103	CD133	Nestina	SOX2	GFAP	β -III Tub	MBP	CD45	CD34	CD90	CD105	Clase 2	Clase 1
PL		++	+	++	++	-	-	-	+++	-	-	+++
NSC		+++	++	++	++	-	-	-	+++	-	-	+++
FBS		++	+	+	++	-	-	-	+++	-	-	+++

GBM103	
PL	74-83,XXYY,add(1)(q32),add(2)(q21)x2,-4-4,der(10)t(7;10)(p11.2;q22)x2,+11,-12,del(13)(q12q14)x2,-14,-14,-15,-16,-16,add(16)(p13.1)x2,der(17)add(17)p(11.2)del(17)(q11.2q21)x2,-19,-19,+0-2mar[cp20]
NSC	64-68,XXY,+Y,-4,-5,der(10)t(7;10)(p11.2;q22),inv(12)(p11.2q15)x2,del(13)(q12q14 x2,-14,der(14;14)(p13;p13),-15,-16,+17,der(17)add(17)p11.2),del(17)(q11.2q21)x2,-18,+19,-20,+21,+0-2mar[cp20]
FBS	61-73,XXY,+Y,+3,-4-6,+7,+8+10,der(10)t(7;10)p11.2;q22)x2,-11,inv(12)(p11.2q15)x2,+13,del(13)(q12q14)x2,-14,-16,der(17)add(17)(p11.2)del(17)(q11.2q21),-18,+20,i(21)(q10),-22,+0-2mar[cp20]

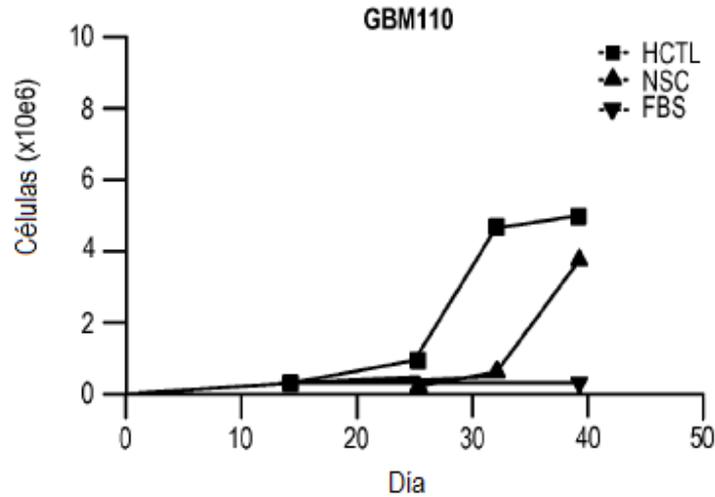
FIG. 24B



GBM106	CD133	Nesina	SOX2	GFAP	β -III Tub	MBP	CD45	CD34	CD90	CD105	Clase 2	Clase 1
PL		+++	+	+	+++	-	-	-	+++	-	-	+++
NSC		+++	++	+	+++	-	-	-	+++	-	-	+++
FBS		+++	-	+	+++	-	-	-	+++	-	-	+++

GBM106	
PL	50,XX,+4,+5,-6,+7,die(10;19)(q26;q13.4),+12,+15,der(20)t(7;20)(q11.2;q13.3),+22[5]/94,slx2[1]/50,XX,+4,+5,-6,+7,+7,add(10)q26),+12,die(12;19)(q24.3;q13.4),+15,psudie(18;18)(p11.2;p11.2),der(20)t(7;20),+22[3]/100,sl2x2[1]/50,XX,dis(3,19)(q29,q13.4),+5,-6,+7,+7,+12,+15,der(20)t(7;20),+22[1]/100,s13x2[1]/51,XX,+4,+5,-6,+7,+7,-10,+12,+15,add(19)(q13.3),der(20)t(7;20),+22[1]/100,sl4x2[5]/54,XX,+4,+5,+7,+7,+12,+12,+15,+15,psudie920,3)(q13.3;q21)+22[2]
NSC	48-63,XX,+4,+5 -6,+7,+7,-10,+12,+15, add(19)(q13.3.0,ser(20)t(7;20)(q11.2;q13.3),+22[cp14]
FBS	49-65,XX, add(2) (q33),+4,+5,-6,+7,+7,die(10;19)(q26;q13.4),+12,+12,+15,+15,add(19)(q13.3), add(20)(q13.1),der(20)t(7;20)(q11.2;q13.3_)+22[cp9]

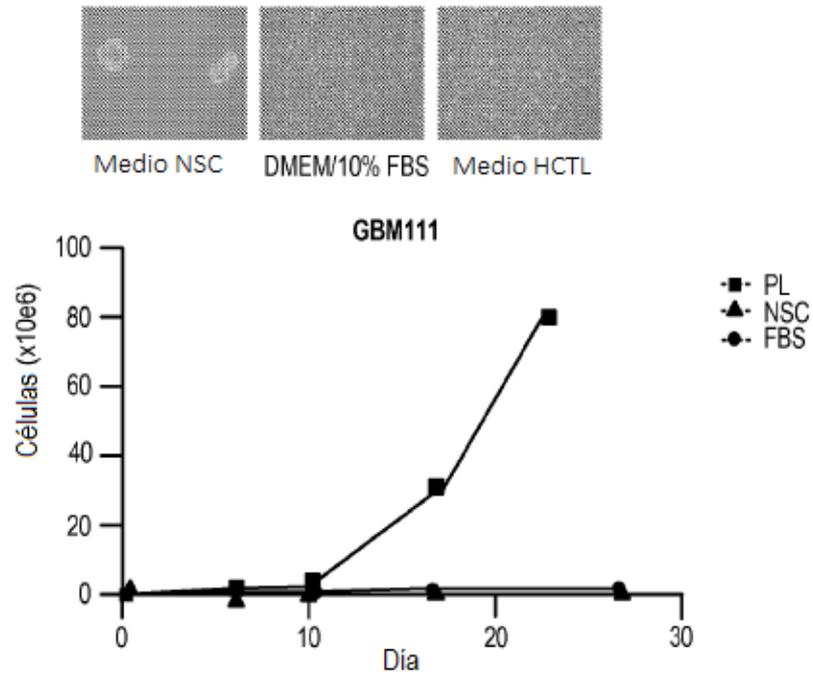
FIG. 24C



GBM110	CD133	Nestina	Sox2	CD45	CD34	CD90	CD105	Clase 1
NSC	<1.0%	+	+	-	+	+++	-	+++
HCTL	<1.0%	+	-	-	+	+++	-	+++
FBS	<1.0%	+	-	-	+	+++	-	+++

GBM110	Cariotipo
Medio NSC	75-84,XXXX,-X,-X,del(1)(q12),-5,-5,-6,+7,+7,+add(7),(q11.2)x2,t(7;18)(p13;p11.2)x2,-8,-10,-10,del(11)(p11.2p13)x2,-12,-13,-13,-14,-14,-15,-15,der(15;21)(q10;q10),i(15)(q10),i(16)(q10),-17,-17,-19,-19,-21,+22,+22,+der(22)t(1;22)(q21;q13),+0-2mar[cp18]/125-153,idemx2[cp2]
Medio HCTL	62-84,XXXX,-1,-2,-2,-3,-4,-5,-5,-6,+7,+7,+7,+add(7)(q11.2)x2,t(7;18)(p13;p11.2)x2,-8,-8,-10,-10,del(11),(p11.2p13)x2,-13,-13,-14,-14,-15,-15,-16,-17,-17,-18,-18,-19,+0-3mar[cp20]
10% FBS	73-83,XXXX,-X,-X,-2,-4,-4,inv(4),(q27q35);-5,del(5)(p11),der(5;15)(q10;q10),-6,+7,+7,+add(7)(q11.2)x2,t(7;18)(p13;p11.2)x2,-10,-10,del(11)(p11.2p13)x2,-13,-13,-14,-14,-15,-15,der(15;21)(q10;q10),i(15)(q10),i(16)(q10),-17,-17,-19,-19,+0-3mar[cp16]/141,idemx2,-i(15)[cp2]/46,XX[2]

FIG. 24D



GBM111	CD133	Nestina	SOX2	GFAP	β -III Tub	MBP	CD45	CD34	CD90	CD105	Clase 2	Clase 1
PL	4.79	+	-	++	+	-	-	-	+++	-	-	+++
NSC	5.82	+	-	++	+	-	-	-	+++	-	-	+++
FBS	0.01	+	-	+	+	-	-	-	+++	-	-	+++

GBM111	Cariotipo
Medio NSC	43-45,XY,t(1;19)(p34.3;q13.3),+7,-9,-10,inv(12)(p13q11),-13,-14,-17,+20,add(21)(p11.2),+1-3mar[cp4]/42-46,sl,t(3;6)(p21;p23)[cp4]/84-86,sdl1x2[cp3]/82-89,XXYY,t(1;19)x2,add(5)(p13),+7,+7,-9,-9,-10,inv(12)x2,-13,-13,-14,-14,+20,+20,add(21)(p11.2)x2,+1-2mar[cp9]
Medio HCTL	46,XY,t(1;19)(p34.3;q13.3),t(3;6)(p21;p23),+7,-10,inv(12)(p13q11),-13,-14,+20,add(21)(p11.2),+1-2mar[cp6]/84-92,idemx2[cp5]/82-88,XXYY,t(1;19)x2,-2,-4,-4,add(5)(p13),+7,+7,-9,-9,-10,inv(12)x2,-13,-13,-14,-14,+20,+20,-21,add(21)x2,+2-3mar[cp9]
10% FBS	54-64,XXY,add(X)(p22.1),+1,add(1)(p13),-3,-4,der(4)t(4;7)(q21;p13),+7,-8,i(8)(q10),-10,-11,psu die(11;15)(p15;p11.2),-12,-13,-14,-16,-17,-18,-18,+20,+21,add(21)(p11.2),-22,+1-4mar[cp20]

FIG. 24E

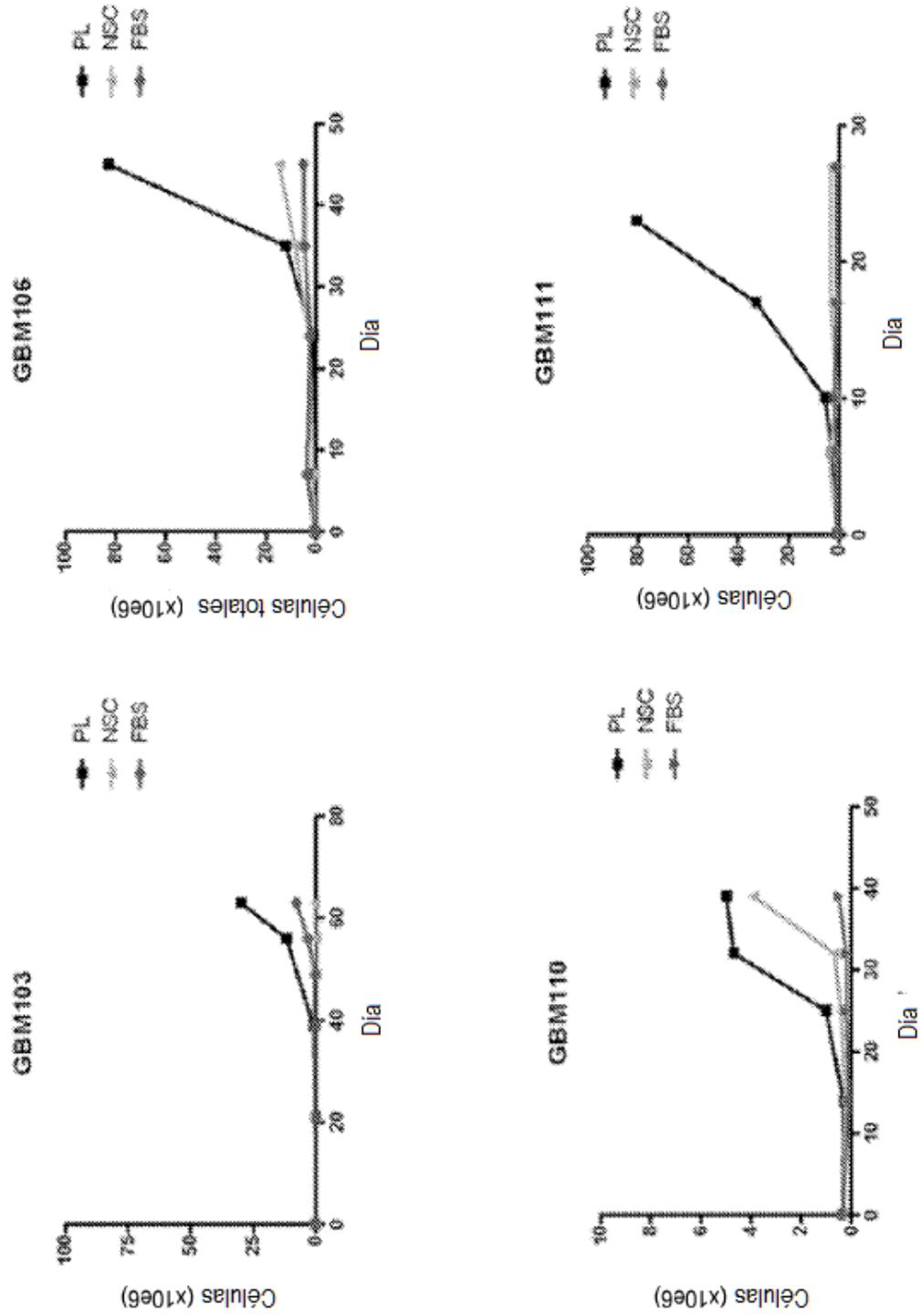


FIG. 25

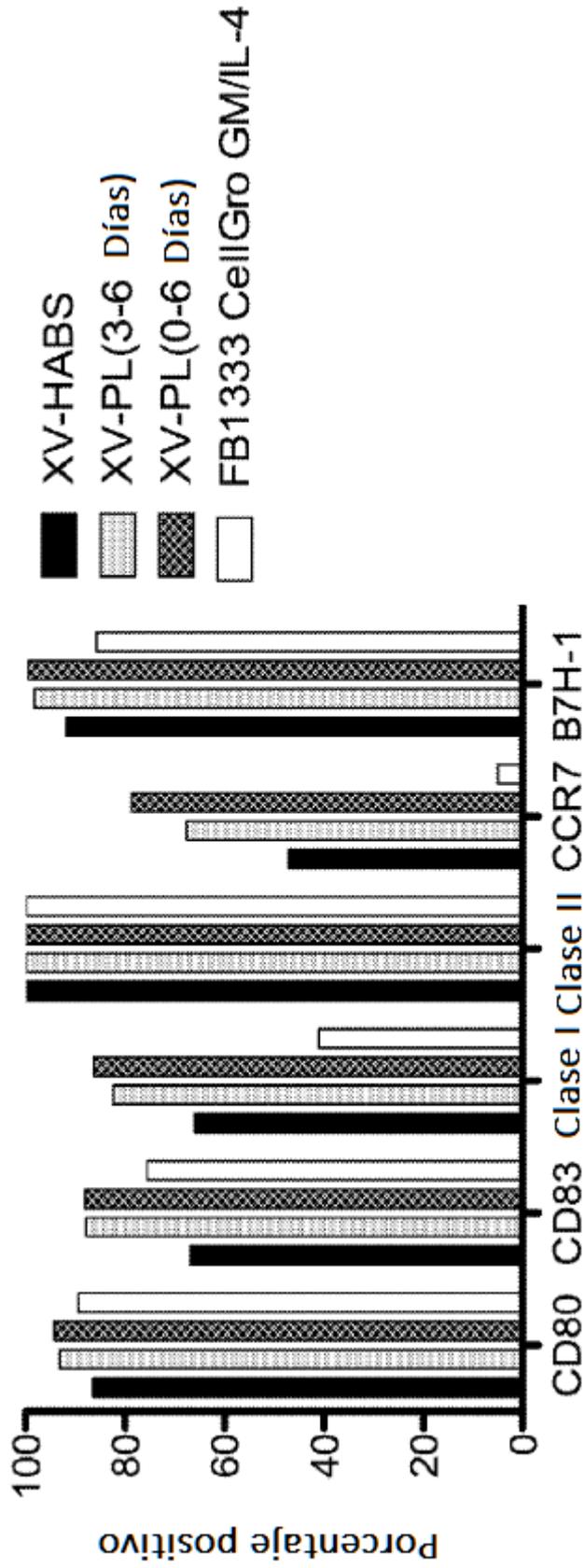


FIG. 26

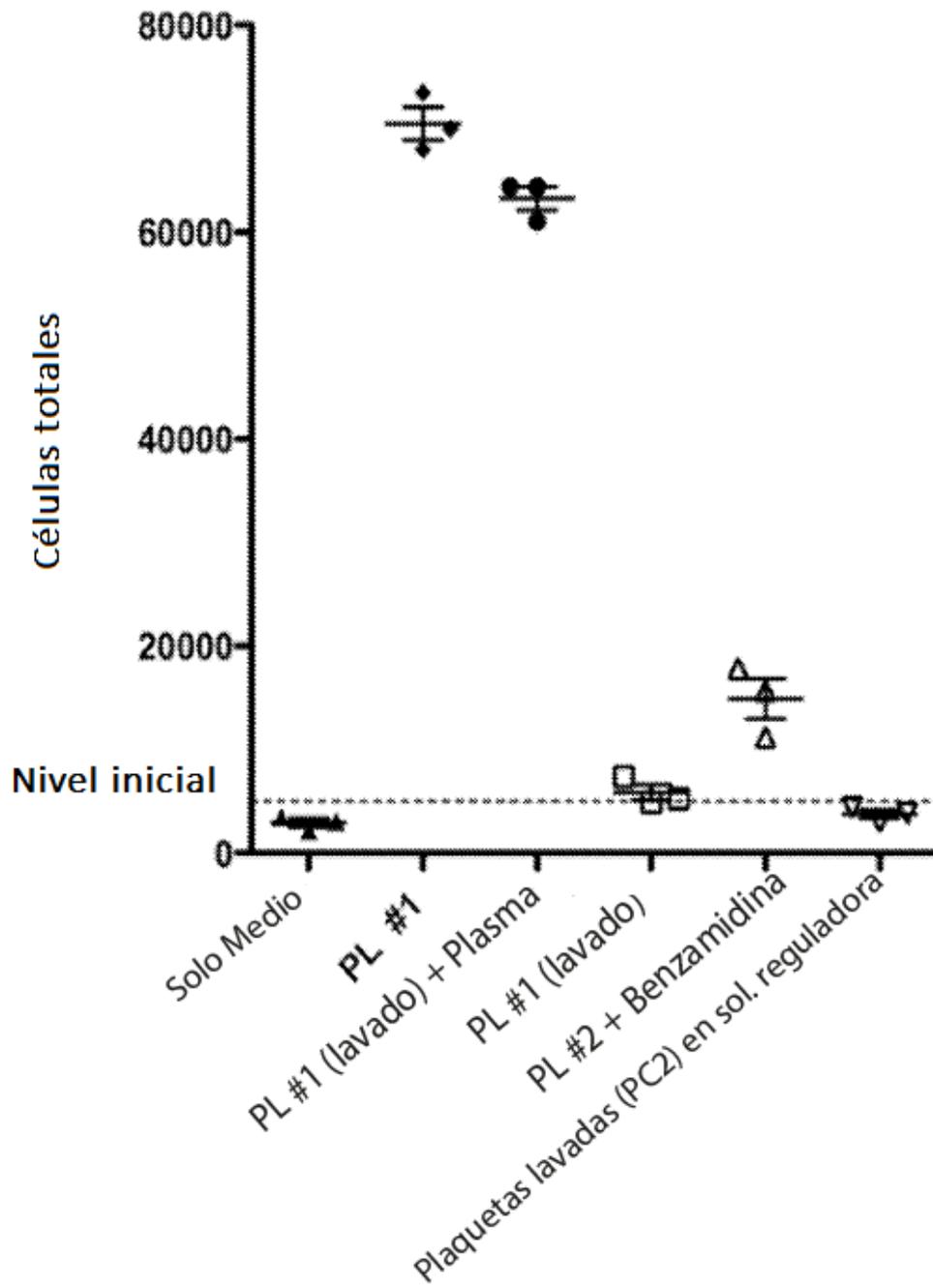


FIG. 27

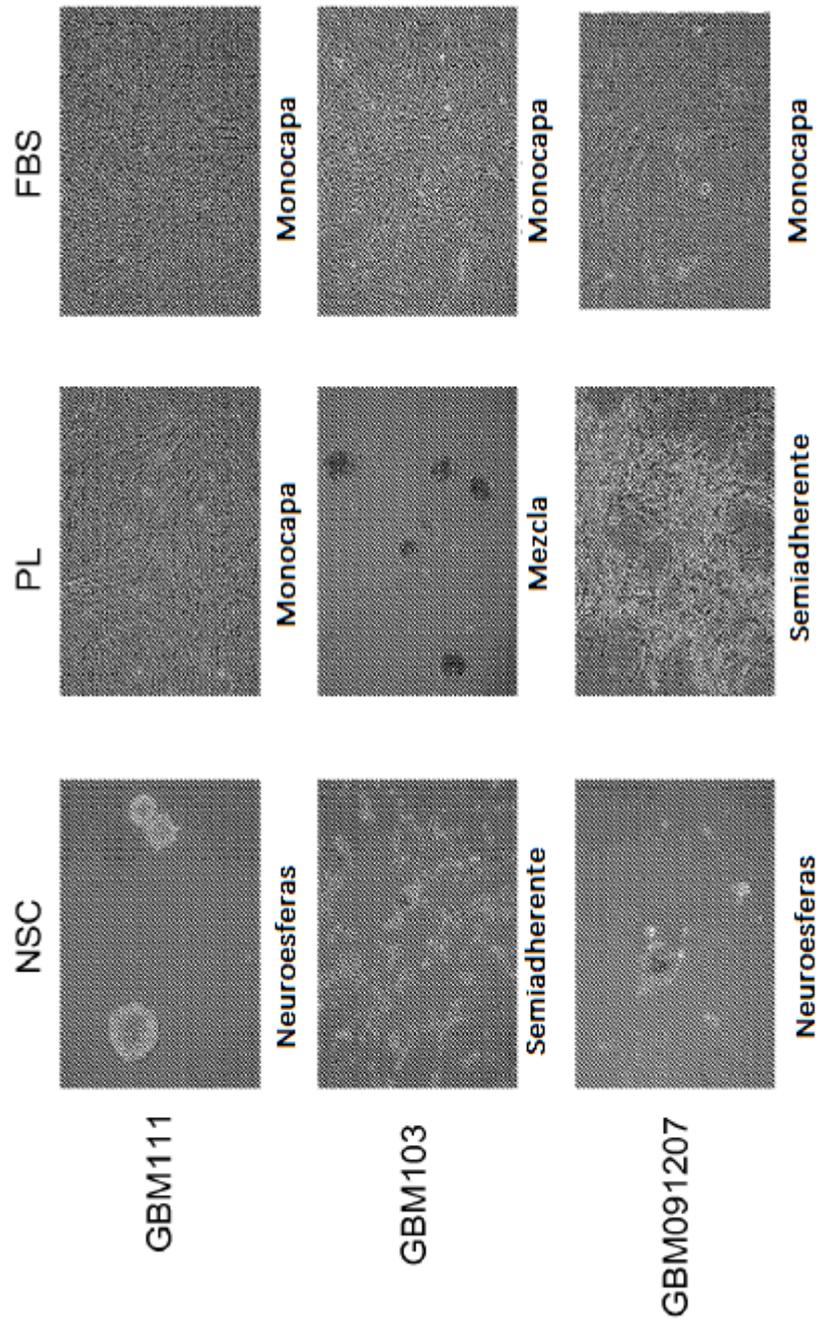


FIG. 28

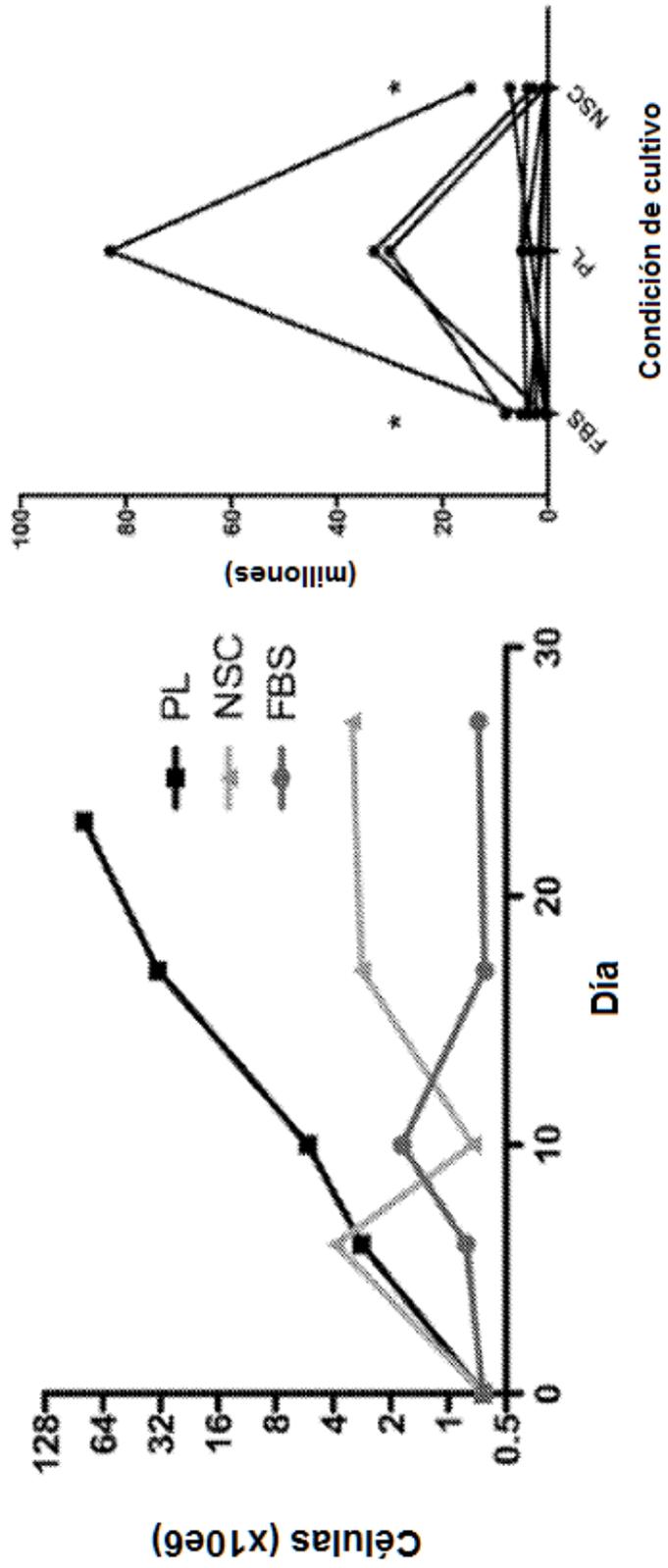


FIG. 29

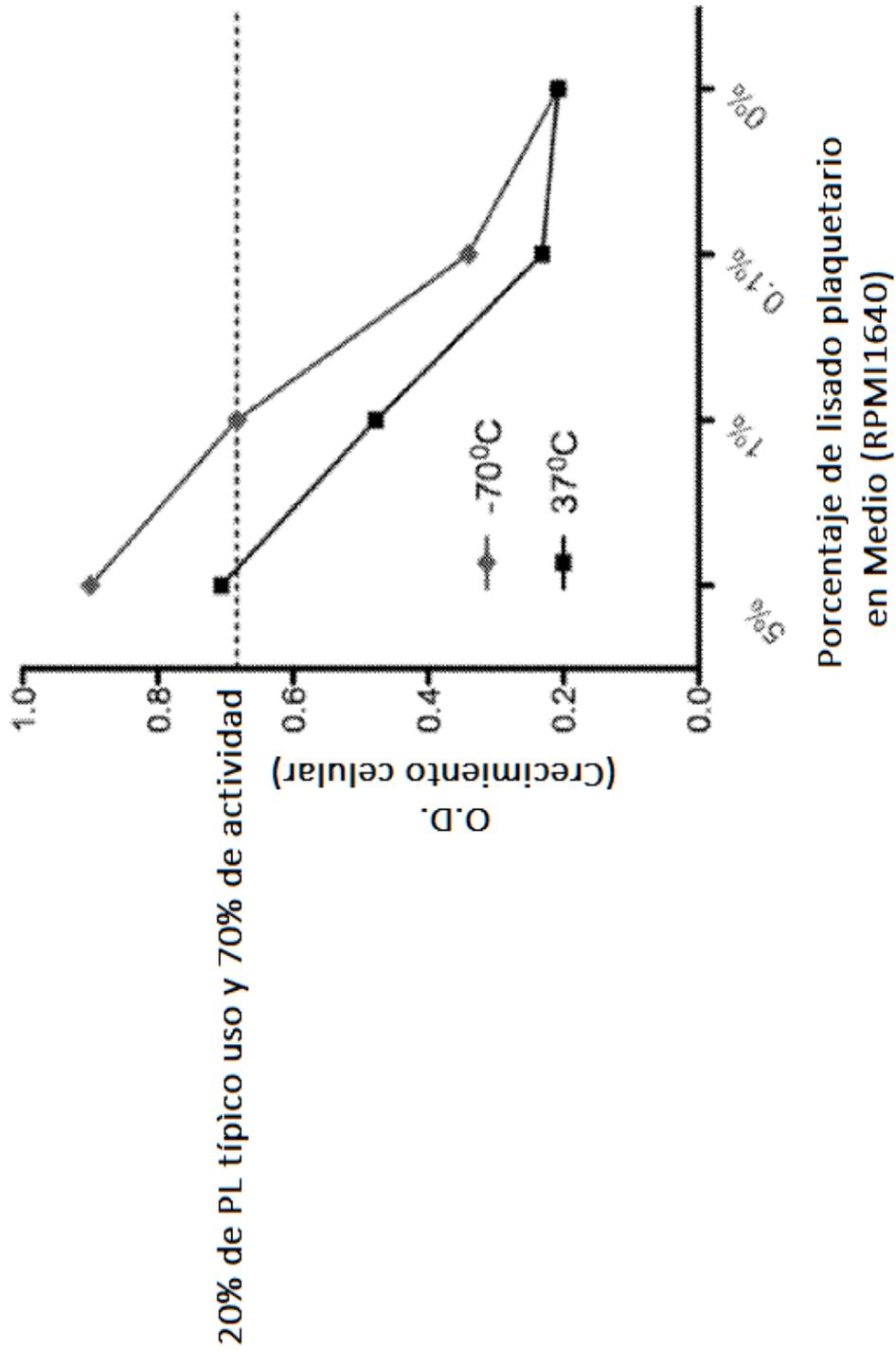


FIG. 30

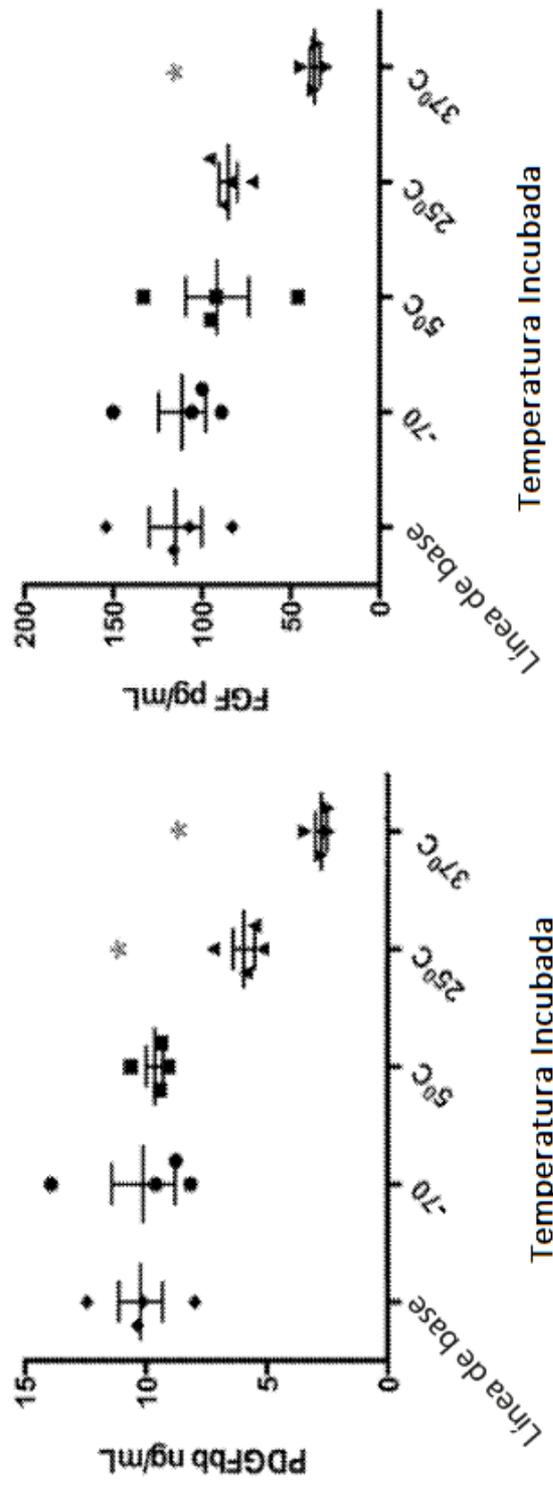


FIG. 31

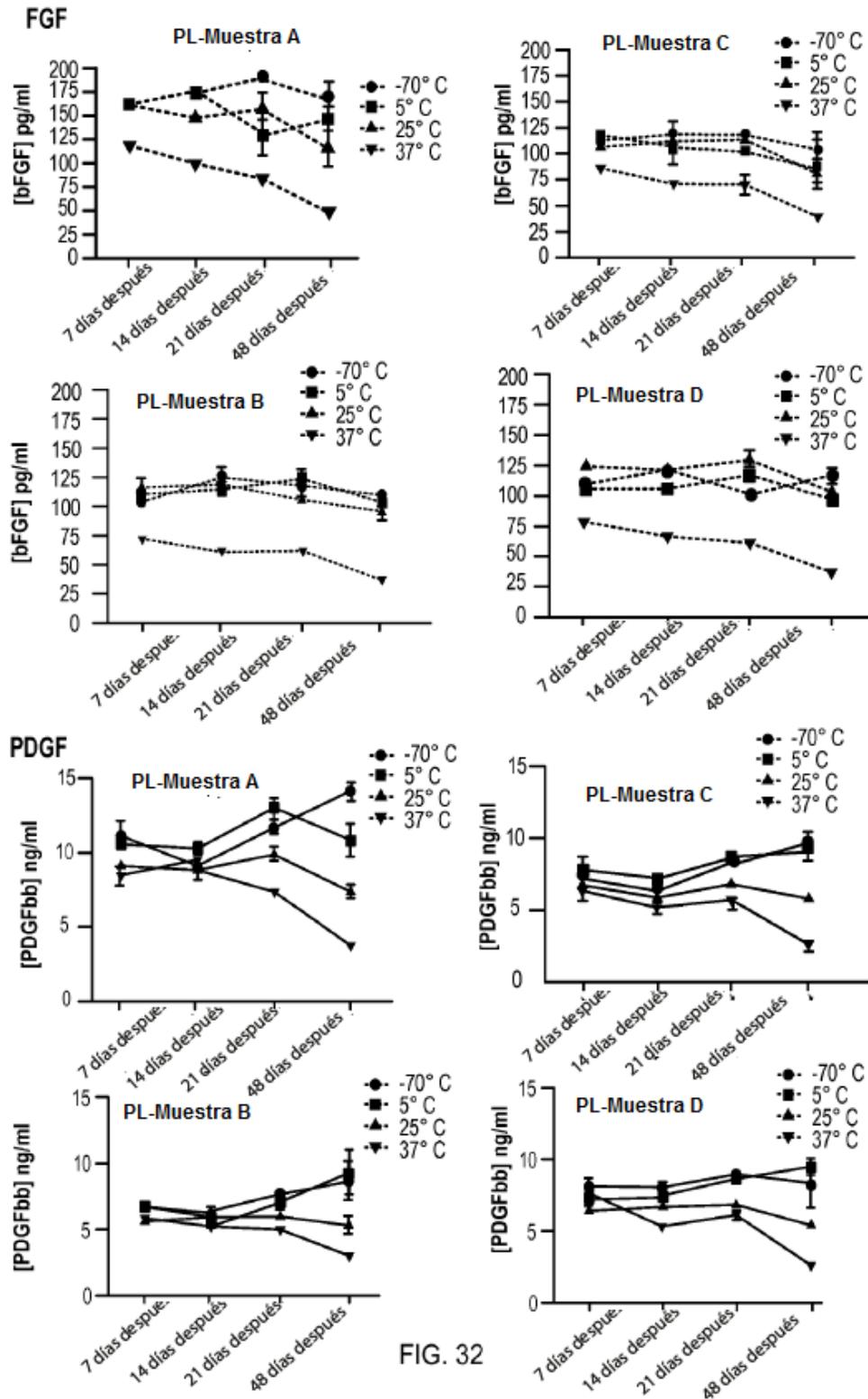


FIG. 32

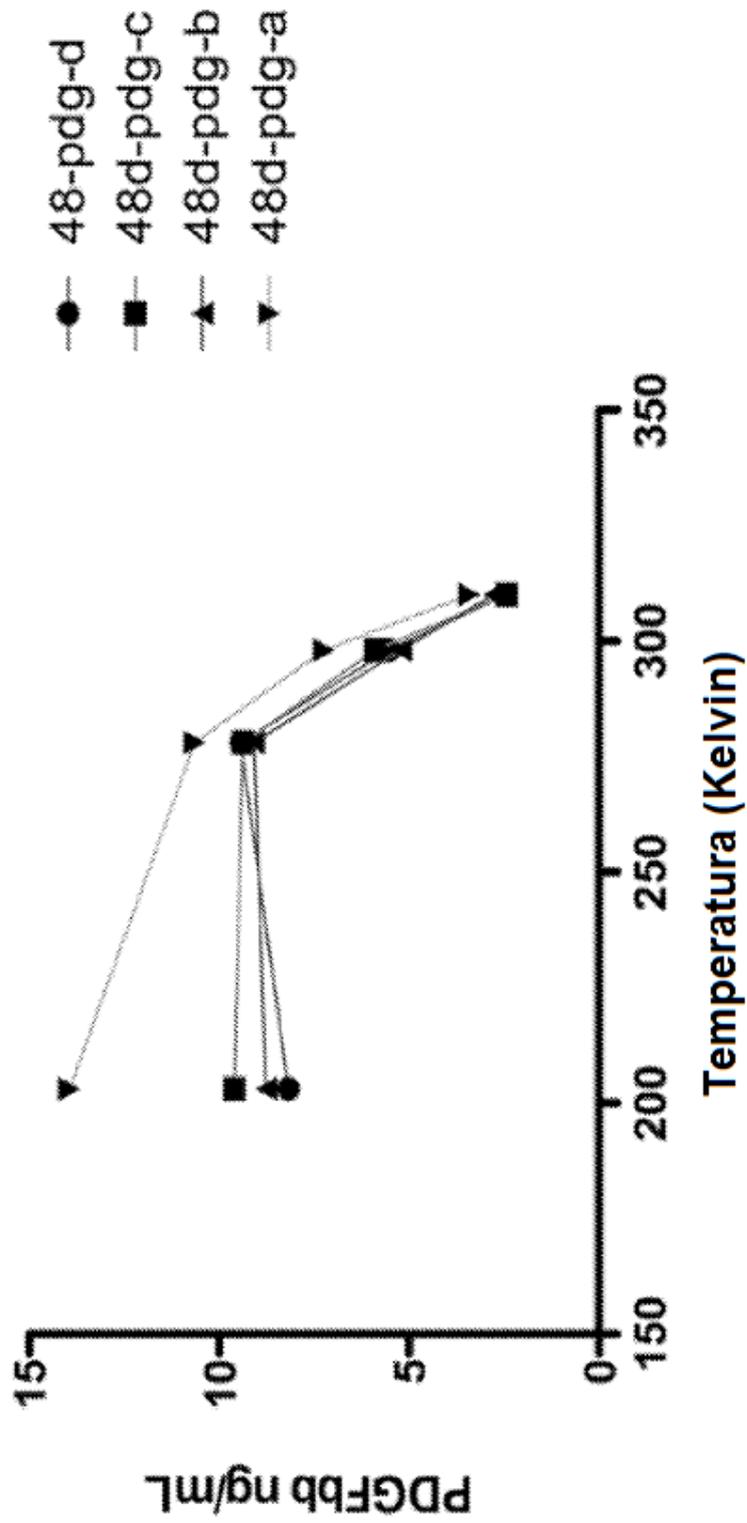


FIG. 33

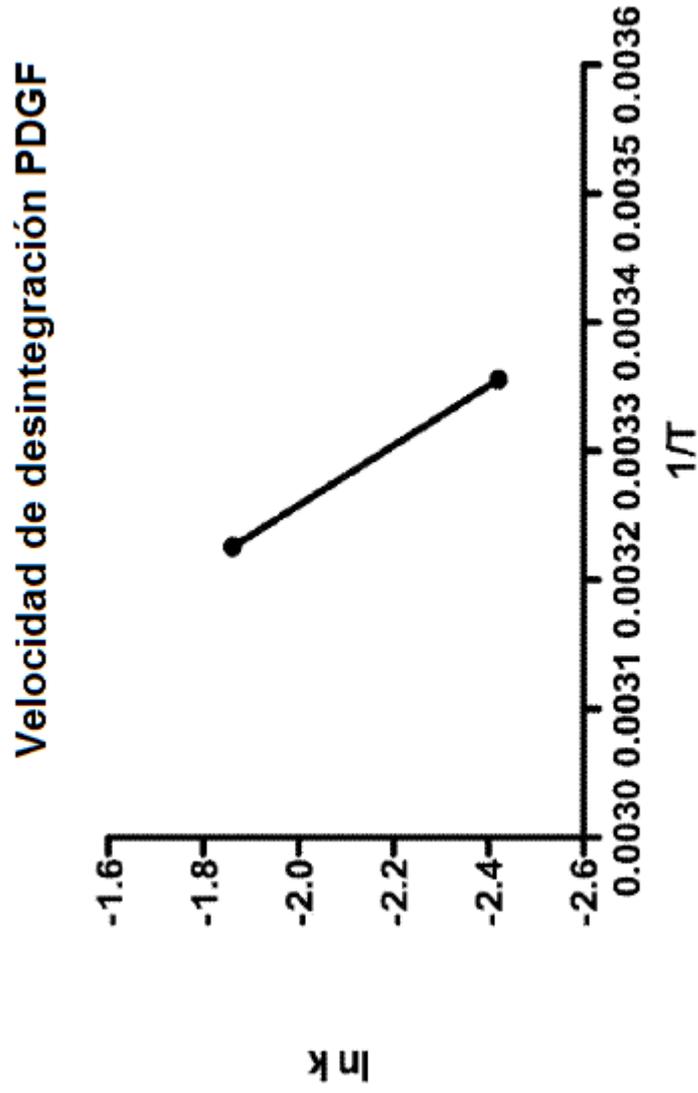


FIG. 34