



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 046**

51 Int. Cl.:
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/0789 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07018574 .9**
96 Fecha de presentación : **21.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2039758**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Medio de cultivo celular y procedimiento de cultivo de células madre y células progenitor.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.02.2011

73 Titular/es: **UNIVERSITÄT LEIPZIG**
Ritterstrasse 26
04109 Leipzig, DE

72 Inventor/es: **Alt, Rudiger y**
Cross, Michael

74 Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

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

[0001] La invención se refiere a la utilización de un medio de cultivo celular que permite una amplia expansión de las células madre somáticas, tales como las células madre hematopoyéticas y/o sus células progenitor tempranas y células madre de línea germinal, manteniendo al mismo tiempo su potencial regenerativo, y a un procedimiento para cultivar células madre y/o sus células progenitor tempranas.

[0002] *Campo Técnico.* Las células madre son células primales que se encuentran en la mayoría de los organismos pluricelulares. Conservan la capacidad de renovarse a sí mismas mediante división celular mitótica y pueden diferenciarse en una gama muy diversa de tipos de células especializadas. Las tres amplias categorías de células madre de mamíferos son: células madre embrionarias, obtenidas a partir de los blastocitos; células madre de línea germinal, responsables de la generación de gametos; y células madre somáticas. El término célula madre somática o adulta se refiere a cualquier célula que no sea una célula embrionaria y una célula madre de línea germinal, y presenta dos propiedades: la capacidad de dividirse y crear otra célula igual que ella misma y dividirse para crear una célula más diferenciada que ella misma. El término célula madre somática se prefiere al de célula madre adulta, ya que las células pueden encontrarse durante el desarrollo y en los niños, así como en adultos. La mayoría de las células madre somáticas generan un número limitado de líneas (multipotentes) y puede hacerse referencia a las mismas por su tejido de origen (por ejemplo, células madre de la médula ósea). O por su potencial de diferenciación (célula madre hematopoyética, célula madre mesenquimal, célula madre endotelial, etc.). Las células

madre hematopoyéticas (HSC) son células madre somáticas que pueden aislarse a partir de la médula ósea o de la sangre, incluyendo la sangre del cordón umbilical. Las HSC son capaces de regenerar las HSC, y diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo las mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/ plaquetas y ciertas células dendríticas) y líneas linfoides (células T, células B, células NK, algunas células dendríticas). Las células progenitor hematopoyéticas se obtienen de las HSC y han perdido la capacidad de constituir una o más de estas líneas, pero aún no son maduras. El término "progenitor tempranas" se refiere a aquellas células obtenidas de forma más directa a partir de las HSC, que conservan la mayoría o la totalidad del potencial de diferenciación, pero que han perdido la capacidad de regenerar las HSC. En un entorno experimental, las HSC conservan la capacidad de regenerar indefinidamente un sistema hematopoyético funcional (actividad de repoblación a largo plazo), mientras que las progenitor tempranas tiene la capacidad de regenerar un sistema hematopoyético dañado durante unos pocos meses (por lo general 3) (actividad de repoblación a corto plazo).

[0003] Para garantizar la auto-renovación, las células madre se someten a dos tipos de división celular. La división simétrica origina dos células hijas idénticas dotadas de propiedades de células madre. La división asimétrica, por otra parte, genera tan sólo una célula madre y una célula progenitor con un limitado potencial de auto-renovación.

[0004] Las cepas celulares son células adaptadas a un cultivo celular, pero con un potencial de división finito. Una línea celular es un cultivo celular permanente que proliferará indefinidamente si se le facilita un medio y un

espacio apropiados. Las líneas celulares difieren de las cepas celulares en que han escapado al límite de Hayflick y se immortalizan. El término células, utilizado en el siguiente texto y en las reivindicaciones incluye células primarias, cepas celulares y líneas celulares.

[0005] Las células madre hematopoyéticas contenidas en fracciones celulares aisladas de la médula ósea o de la sangre se han utilizado durante muchos años para generar un sistema sanguíneo e inmune funcional en pacientes cuyos propios sistemas han resultado dañados por la quimioterapia, una enfermedad o la exposición a radiación. No obstante, la baja frecuencia y la inactividad mitótica típicas de las células madre de tejidos sigue constituyendo una importante barrera para su análisis y aplicación clínica. Por ello, el número de células madre terapéuticas en la sangre de un solo cordón umbilical suele considerarse insuficiente para trasplantarlas a un paciente adulto, mientras que la modificación genética de células madre cultivadas, a efectos de terapia celular, está limitada tanto por su baja frecuencia como por su baja actividad mitótica, en comparación con la diferenciación de progenitor. Igualmente, el bajo número de células madre hematopoyéticas puede impedir que se intente generar material, bien para el trasplante repetido de HSCs o para su reprogramación en volúmenes terapéuticamente útiles de tejidos no hematopoyéticos.

[0006] *Estado de la técnica.* Por estos motivos, ha habido muchos intentos de establecer unas condiciones de cultivo bajo las cuales las células madre hematopoyéticas puedan expandirse (Hofmeister et al., 2007). Estos incluyen cultivos efectuados en contacto directo con células de apoyo (estromales); la utilización de medios condicionados por células de apoyo; y el complemento de los medios con diversas

sustancias que favorezcan la supervivencia y la proliferación de células indiferenciadas.

[0007] Los medios utilizados para el cultivo de células madre hematopoyéticas hasta la fecha se ha basado en la adaptación y complementación de medios basales estándar (incluyendo el medio basal de Tagle, el medio de Tagle modificado por Dulbecco, el medio de Dulbecco modificado por Iscove, el medio de Fischer y el medio de Glasgow), que contienen glucosa (por lo general, a unas concentraciones de entre 1 g/l y 4,5 g/l) e inositol (por lo general, en forma de mio-inositol, cis-1,2,3,5-trans-4,6-ciclohexanoheptol, a concentraciones de entre 1 mg/l y 36 mg/ml). El medio mínimo esencial de Eagle (MEM) contiene 1 g/l de glucosa y 2 mg/l de Inositol.

[0008] La glucosa es una de las principales fuentes de carbono y energía, y en general se asume que es necesaria para el cultivo de todas las células de mamíferos, a excepción de unos pocos tipos celulares que son capaces de sintetizar su propia glucosa mediante gluconeogénesis. Los medios denominados bajos en glucosa contienen generalmente 1 g/l de glucosa, mientras que los denominados de alto contenido en glucosa contienen 4,5 g/l de glucosa. El inositol es un constituyente esencial de una familia de moléculas (fosfatidilinositol y los fosfatos del inositol) que son necesarios para la comunicación de señales procedentes de diversos receptores de reguladores extracelulares de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular. Aunque el inositol puede sintetizarse intracelularmente a partir de la glucosa, lo normal es incluir inositol en el medio. Las concentraciones solían variar ampliamente entre 0,05 mg/l y 36 mg/l. Un medio disponible comercialmente y explícitamente diseñado para el

cultivo de células hematopoyéticas y progenitor (Methostem, PAA Laboratories) contiene 4,5 g/l de glucosa y 7,2 mg/l de inositol como mio-inositol).

5 **[0009]** El documento US 5747341 describe un medio de cultivo celular con baja osmolaridad para el establecimiento y el mantenimiento de células segregadoras de hormonas en cultivos celulares. La fórmula VI, con un contenido de glucosa de 360 mg/l está diseñada específicamente para un corto período de escasez de glucosa en cultivos de células
10 pancreáticas, a fin de comprobar la posterior respuesta a la glucosa.

[0010] Stolzing y otros (Rejuvenation Research 9(1): 31-35) describen la senescencia replicativa inducida por la glucosa en células madre mesenquimales. Se examinó el efecto
15 de concentraciones de glucosa de entre 250 mg/l hasta 4500 mg/l.

[0011] *Deficiencias de las soluciones conocidas.* En ninguna de las formulaciones de medios disponibles hasta la fecha ha sido posible conseguir una amplia expansión de las
20 células madre hematopoyéticas (HCS) sin que disminuya su potencial regenerativo, asociándose estrechamente la división de las células madre en las condiciones del cultivo con la progresiva diferenciación (Wilson y Trumpp, 2006).

[0012] El primer objetivo de la invención consiste en
25 proporcionar un medio de cultivo celular que permita el cultivo y la expansión de las células madre somáticas o las células madre de línea germinal y su células progenitor tempranas, en especial las células madre hematopoyéticas y sus células progenitor tempranas, manteniendo su potencial regenerativo. Un segundo objetivo de la invención consiste en
30 un procedimiento para cultivar, amplificar y/o enriquecer las células madre, especialmente las células madre

hematopoyéticas y/o sus células progenitor tempranas, utilizando el medio de cultivo celular de la invención.

[0013] El primer objetivo se resuelve, de acuerdo con la reivindicación 1, mediante la utilización de un medio de cultivo de células madre que sea deficiente en glucosa e inositol.

[0014] La nueva solución a este problema se basa en el reconocimiento y la caracterización de la actividad metabólica inusual de las células madre somáticas y de las células madre de línea germinal, especialmente las células madre hematopoyéticas. Nuestra propia investigación ha demostrado que, a pesar de que la mayoría de las células mueren rápidamente, como se preveía, en un medio deficiente en glucosa e inositol, las células madre hematopoyéticas son capaces de sobrevivir y crecer en estas condiciones. Esto demuestra que las vías metabólicas y de señalización en células madre hematopoyéticas difieren enormemente de las de su progenie más diferenciada. En resumen, aunque las células diferenciadas utilizan importantes cantidades de glucosa (para el metabolismo) e inositol (para la propagación de señales mediadas por receptores que influyen en la supervivencia y la proliferación), siendo escasa o inexistente la necesidad de glucosa e inositol en HSCs. En este caso, lo importante es que muchos factores de crecimiento que soportan la diferenciación de las progenitor, las células leucémicas o las células maduras *in vitro* activan las vías de señalización dependiente del inositol, mientras que algunos de los factores de crecimiento que proporcionan HSCs de soporte específico *in vitro* (como las que activan las vías Wnt, Notch y Hedgehog) dependen mucho o totalmente del inositol. En cambio, la presencia de glucosa e inositol a unos niveles funcionales en el metabolismo y la señalización

respalda la diferenciación de las células madre y conduce a una acumulación de células que han perdido el potencial de células madre. Esta invención aporta un medio previamente desconocido para aislar selectivamente, mantener y hacer que proliferen las HSCs.

[0015] De este modo, de acuerdo con la invención, la cantidad de glucosa e inositol en el medio de cultivo celular se mantiene por debajo de los niveles requeridos para la producción de células con diferenciación.

[0016] El medio de cultivo celular de acuerdo con la invención consiste preferiblemente en un medio basal que puede ser proporcionado como líquido, solución concentrada o en polvo, en el que la solución concentrada o el polvo se disuelven en agua esterilizada antes de su aplicación. El medio basal está esencialmente exento de glucosa e inositol, lo que quiere decir que contiene menos de 10 mg/l de glucosa y menos de 10 µg/l de inositol en el medio diluido.

[0017] El medio basal deficiente en glucosa e inositol contiene preferiblemente otros ingredientes habituales de un medio basal estándar, incluyendo sales inorgánicas, un sistema tampón, aminoácidos, ácidos grasos / lípidos, piruvato y vitaminas, nucleósidos, un indicador de pH y un agente reductor biocompatible. No obstante, la inclusión de glutamato (para una concentración final de 10 a 500 mg/l) se prefiere a la de glutamina, a fin de permitir la eliminación del exceso de grupos amino (mediante la conversión de glutamato en glutamina) derivada del catabolismo de los aminoácidos en ausencia de niveles metabólicos de glucosa. Además, la concentración final de cada nucleósido es preferiblemente inferior a 1 mmol.

[0018] Ventajosamente, el medio basal puede almacenarse durante meses. Antes de su aplicación, el medio basal se

complementa preferiblemente mediante suero (por ejemplo, bovino, caballar o humano) o un componente sustitutivo del suero. En una realización preferida, se utiliza suero autólogo. Preferiblemente, el suero se dializa para reducir la glucosa y el contenido de inositol. Preferiblemente, el suero se añade al medio para obtener un contenido final comprendido entre un 0,5% y un 30%, preferiblemente de un 1 a un 20% y más preferiblemente de un 5 a un 10%.

[0019] El sustituto del suero contiene preferiblemente las proteínas del suero albúmina y transferrina (preferiblemente saturada con hierro), selenio y ácidos grasos esenciales, tales como ácidos grasos no saturados C16-C24. Preferiblemente no contiene Ig y mitógenos detectables. Pueden utilizarse sustitutos del suero disponibles comercialmente si el contenido de glucosa e inositol es suficientemente bajo, las proteínas del sustituto del suero se aíslan a partir de una fuente natural (bovina, caballar o humana) o se fabrican de forma recombinante.

[0020] Preferiblemente, el suero o sustituto del suero se desactivan por calor.

[0021] Entre los posibles suplementos adicionales del medio basal o del medio de cultivo celular incluyen albúmina, selenio, transferrina, ácidos grasos esenciales, glutamato, lactato, glutamina, agentes reductores biocompatibles (como glutatión o mercaptoetanol), factores de crecimiento y otros moduladores (activadores o inhibidores) de vías de señalización celular.

[0022] Los factores de crecimiento preferidos y los moduladores de vías de señalización celular que han de añadirse al medio son factores que soportan la proliferación de células madre a través de vías independientes del inositol. Los factores de crecimiento preferidos se

seleccionan entre los factores Wnt/Wingless, Notch ligand, Hedgehog y las familias de la angiopontina, así como la interleucina-3, la interleucina-6, el factor de células madre, la trombopoietina, FLT3-L (tirosina quinasa de hígado fetal 3) Los factores de crecimiento se aíslan de la fuente natural o se producen preferiblemente por recombinación. Entre los ejemplos de moduladores de las vías de señalización celular se encuentran: ADP ribosa cíclica (cADPR); agonista Hedgehog (Hh-Ag) e inhibidores farmacológicos de la actividad del glicógeno sintasa quinasa-3.

[0023] De acuerdo con la invención, el contenido de glucosa e inositol del suero o de otros componentes y a complementar se mantiene muy bajo. Este bajo contenido de glucosa e inositol del suero se consigue preferiblemente mediante diálisis y/o degradación enzimática de la glucosa.

[0024] Debido al bajo contenido de glucosa e inositol del medio basal, el suero (o el sustituto del suero) y todos los posibles complementos adicionales, se garantiza que el medio final utilizado para el cultivo celular contiene menos de 500 mg/l de glucosa, preferiblemente menos de 100 mg/l de glucosa, más preferiblemente menos de 10 mg/l de glucosa y menos de 500 µg/l de inositol, preferiblemente menos de 100 µg/l de inositol, y más preferiblemente, menos de 10 µg/l inositol.

[0025] Adicionalmente, el medio basal, así como el medio de cultivo celular, contiene menos de 500 mg/l, preferiblemente menos de 100 mg/l, más preferiblemente menos de 10 mg/l, de otros azúcares distintos de la glucosa (como fructosa, manosa o galactosa) que se catabolizan mediante vía glicolítica. El medio también contiene preferiblemente menos de 500 µg/l, preferiblemente menos de 100 µg/l, más preferiblemente menos de 10 µg/l, equivalentes de inositol en

sustancias que contienen inositol, como fosfatos de inositol, fosfatidilinositol (PI) y lípidos de fosfato de fosfatidilinositol (PIP).

5 **[0026]** Las cantidades relativas preferidas (respecto de la disolución final) de los diversos componentes del medio basal se enumeran a continuación. Como la mayoría de estos componentes también están incluidos en el suero, las cantidades necesarias en el medio basal dependen a menudo del contenido de suero del medio de cultivo celular final.

10 **[0027]** El medio basal contiene preferiblemente una combinación de sales que suelen estar presentes en medios basales estándar, para proporcionar un sistema tampón y una fuente de los siguientes iones: sodio, cloruro, potasio, magnesio, calcio, cloro, fósforo, azufre, selenio y
15 preferiblemente zinc, hierro y cobre.

[0028] Las sales preferidas y sus concentraciones preferidas en el medio basal (disolución final) se seleccionan en la lista siguiente:

20 Cloruro cálcico (preferiblemente $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): entre 1 mg/l y 300 mg/l; preferiblemente entre 100 mg/l y 250 mg/l.

Cloruro potásico (KCl) entre 200 mg/l y 600 mg/l, preferiblemente entre 250 mg/l y 400 mg/l.

25 Sulfato de magnesio (preferiblemente $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): entre 50 mg/l y 400 mg/l; preferiblemente entre 150 mg/l y 300 mg/l.

Cloruro sódico (NaCl): entre 4000 mg/l y 10000 mg/l; preferiblemente entre 4500 mg/l y 6000 mg/l.

Carbonato sódico de hidrógeno (NaHCO_3): entre 300 mg/l y 5000 mg/l; preferiblemente entre 2000 mg/l y 3000 mg/l.

30 Fosfato dihidrogenado de sodio (preferiblemente $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): entre 50 mg/l y 1000 mg/l; preferiblemente entre 100 mg/l y 300 mg/l.

Nitrato de hierro (preferiblemente $\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$); entre 0 mg/l y 2 mg/l.

Sulfato de Zinc (preferiblemente $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): entre 0 mg/l y 2 mg/l.

5 Sulfato de cobre (preferiblemente $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): entre 0 mg/l y 0,1 mg/l.

Carbonato sódico de hidrógeno (NaHCO_3) para aportar un sistema tampón en combinación con el CO_2 suministrado por la atmósfera. Entre 300 mg/l y 5000 mg/l.

10 HEPES ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetano sulfónico) para proporcionar un sistema tampón adicional: entre 0 g/l y 10 g/l.

[0029] El medio basal contiene adicionalmente aminoácidos, incluidos en los medios basales estándar. No obstante, una
15 baja concentración o ausencia de glutamina, en combinación con una elevada concentración de glutamato, se prefiere para aportar un aceptante del exceso de grupos amino generados por el catabolismo de los aminoácidos. El medio basal preferiblemente contiene menos de 200 mg/l, y más
20 preferiblemente menos de 50 mg/l, L-glutamina y entre 10 mg/l y 500mg/l, preferiblemente de 100 mg/l a 400 mg/l, L-glutamato (respecto de la solución diluida final).

[0030] Adicionalmente, se prefiere una elevada concentración de serina, junto con glicina, cisteína o ambas.
25 El medio basal preferiblemente contiene entre 10 mg/l y 200 mg/l de L-serina, preferiblemente entre 20 mg/l y 50 mg/l de serina, y entre 5 mg/l y 100 mg/l de glicina, preferiblemente entre 10 y 50 mg/l de L-glicina y/o entre 5 mg/l y 200 mg/l de L-cisteína, preferiblemente entre 20 y 50 mg/l de L-
30 cisteína.

[0031] Los aminoácidos preferidos y sus concentraciones preferidas en el medio basal (disolución final) se seleccionan en la lista siguiente:

	L-alanina	entre 5 mg/l y 50 mg/l.
5	L-asparagina	entre 5 mg/l y 20 mg/l.
	L-arginina	entre 10 mg/l y 200 mg/l.
	L-aspartato	entre 5 mg/l y 50 mg/l.
	L-cisteína	entre 5 mg/l y 200 mg/l.
	L-glutamato	entre 10 mg/l y 500 mg/l.
10	L-glutamina	entre 0 mg/l y 200 mg/l.
	Glicina	entre 5 mg/l y 100 mg/l.
	L-hisitidina	entre 5 mg/l y 100 mg/l.
	L-isoleucina	entre 10 mg/l y 150 mg/l.
	L-leucina	entre 10 mg/l y 150 mg/l.
15	L-lisina	entre 10 mg/l y 150 mg/l.
	L-metionina	entre 5 mg/l y 150 mg/l.
	L-fenilalanina	entre 10 mg/l y 100 mg/l.
	L-prolina	entre 5 mg/l y 50 mg/l.
	L-serina	entre 10 mg/l y 200 mg/l.
20	L-treonina	entre 10 mg/l y 100 mg/l.
	L-triptófano	entre 2 mg/l y 20 mg/l.
	L-tirosina	entre 10 mg/l y 100 mg/l.
	L-valina	entre 10 mg/l y 100 mg/l.

[0032] El medio basal contiene preferiblemente vitaminas.

25 Las vitaminas preferidas y sus concentraciones preferidas en el medio basal (disolución final) se seleccionan en la lista siguiente:

	Pantotenato	entre 0 mg/l y 15mg/l
		preferiblemente, entre 2 y 6 mg/l
30	Colina	entre 0 mg/l y 50 mg/l,
		Preferiblemente, entre 2 y 6 mg/l
	Ácido fólico	entre 0 mg/l y 20 mg/l,

- preferiblemente entre 2 y 6 mg/l,
 Nicotinamida entre 0 mg/l y 20 mg/l,
 preferiblemente entre 2 y 6 mg/l,
 Piridoxina entre 0 mg/l y 10 mg/l,
 5 preferiblemente entre 2 y 6 mg/l,
 Riboflavina entre 0 mg/l y 2 mg/l,
 preferiblemente entre 0,05 y 0,5 mg/l
 Tiamina entre 0 mg/l y 10 mg/l,
 preferiblemente entre 2 y 6 mg/l,
 10 Vitamina B12 entre 0 y 5 mg/l,
 preferiblemente entre 0,01 mg/l y 2 mg/l,
 Vitamina E (Tocoferol)
 entre 0 mg/l y 10 mg/l,
 preferiblemente entre 2 y 6 mg/l.
- 15 **[0033]** Preferiblemente, el medio basal contiene nucleósidos entre 1 mg/l y 1 g/l, preferiblemente entre 1 mg/l y 50mg/l de adenosina, guanosina, citidina y uridina (respecto de la solución final diluida).
- [0034]** Los componentes adicionales preferidos y sus
 20 concentraciones en el medio basal (disolución final) se seleccionan a partir de la lista siguiente:
- Indicador de pH,
 tal como fenol rojo entre 0 mg/l y 20 mg/l,
 Piruvato entre 0 mg/l y 550 mg/l,
 25 Lactato entre 0 mg/l y 550 mg/l,
 Ácido linoleico entre 0 mg/l y 1 mg/l,
 Ácido linolénico entre 0 mg/l y 1 mg/l,
 Ácidos grasos no esenciales entre 0 mg/l y 10 mg/l,
 Colesterol entre 0 mg/l y 100 mg/l,
 30 Ácido lipoico entre 0 mg/l y 5 mg/l.
- [0035]** Con anterioridad a su utilización, el medio se complementa preferiblemente con suero procedente de fuentes

humanas, bovinas o equinas, para obtener un contenido final de entre 0,5% y 30% v/v, preferiblemente de 1 a 20% v/v, más preferiblemente 5 a 10% v/v. Antes de su utilización, se reduce el contenido de glucosa e inositol del suero, preferiblemente mediante diálisis, de forma que el medio final utilizado para el cultivo celular contiene menos de 500 mg/l de glucosa, preferiblemente menos de 100 mg/l de glucosa, y más preferiblemente menos de 10 mg/l de glucosa y menos de 500 µg/l de inositol, preferiblemente menos de 100 µg/l de inositol, más preferiblemente menos de 10 µg/l de inositol.

[0036] Preferiblemente, el medio basal o de cultivo celular se complementa adicionalmente con uno o más de los siguientes componentes:

Albúmina (preferiblemente, esencialmente libre de ácidos grasos y globulina) preferiblemente de fuentes humanas, bovinas, porcinas, equinas o recombinantes: entre 0,1 g/l y 10g/l,

Selenita sódica (NaSeO₃): entre 0,005 mg/l y 0,05 mg/l,

Transferrina: entre 0,01 mg/l y 1 mg/l,

Glutathione: entre 0,001 mg/l y 2 mg/l,

Mercaptoetanol: entre 1 µM y 500 µM

Glutamina: entre 0 g/l y 200 g/l

[0037] El medio también se puede complementar mediante concentraciones biológicamente activas de factores de crecimiento y otros activadores o inhibidores de vías de señalización celular (se citaron ejemplos anteriormente).

[0038] La combinación y concentración de componentes se selecciona para que de cómo resultado una osmolaridad del medio basal comprendida entre 0,28 y 0,4 Osm/Kg antes de complementarse. La osmolaridad del medio complementado debería ajustarse entre 0,32 y 0,36 Osm/Kg, preferiblemente

de 0,36 Osm/Kg antes de su utilización. La Osmolaridad se ajusta normalmente mediante disolución con agua esterilizada (para reducir la osmolaridad) o añadiendo cloruro sódico para aumentar la osmolaridad.

5 **[0039]** El medio de cultivo celular de acuerdo con la invención se utiliza para cultivar células madre somáticas o células madre de línea germinal (tales como células madre espermato goniales), incluyendo células primarias, cepas celulares o líneas celulares de las células madre
10 anteriormente mencionadas.

[0040] Las células madre somáticas incluyen concretamente células madre hematopoyéticas y células progenitor tempranas, así como células madre epiteliales (concretamente, de la piel o del intestino) y células madre obtenidas del tejido
15 adiposo.

[0041] La principal ventaja del medio de cultivo de células madre de acuerdo con la invención es que permite el cultivo y la expansión sin diferenciación no pretendida de las células madre, manteniendo las características de las
20 células madre.

[0042] El medio de acuerdo con la invención puede utilizarse para:

 1. Purificar las células madre somáticas o células madre de línea germinal (enriquecimiento de células madre
25 alejado de otros tipos de célula);

 2. Cultivo de células madre somáticas o células madre de línea germinal que mantengan su función como células madre;

 3. Amplificación de células madre somáticas o células madre de línea germinal que mantengan su función como células
30 madre;

4. Purificación de células madre o leucémicas procedentes de células leucémicas de la sangre o médula ósea provenientes de un paciente con leucemia;

5. Cultivo de células madre somáticas o células madre de línea germinal que mantengan la integridad genética de las células.

[0043] Otro objeto de la invención es un procedimiento para cultivar, amplificar, purificar y/o enriquecer células madre somáticas o células madre de línea germinal, en el que las células se cultivan en un medio de cultivo celular de la invención, o preferiblemente, en una atmósfera que contenga entre un 0,1% y un 5% de O₂ (v/v). Preferiblemente, la atmósfera contiene de un 4 a un 6% de CO₂. El resto es un gas bioquímicamente inerte, tal como N₂.

[0044] La invención también se refiere a un procedimiento para la purificación de células madre somáticas o células madre de línea germinal (enriquecimiento de células madre alejado de otros tipos de células) mediante el cultivo de una célula madre que contenga una mezcla celular, obtenidas por ejemplo, de sangre o médula ósea, en el medio de la invención. El enriquecimiento de estas células madre se logra debido al hecho de que la mayoría de las células no madre dependen de la glucosa como fuente de energía, y del inositol (que puede obtenerse de la glucosa) para transmitir señales mediadas por receptor que soporten células madre somáticas o células madre de línea germinal que respalden la supervivencia, la proliferación y la diferenciación. De este modo, no crecerán en el medio de acuerdo con la invención.

[0045] Este procedimiento se refiere preferiblemente a un enriquecimiento preliminar que utiliza uno de los diversos procedimientos de uso general, y posteriormente, la introducción de la mezcla celular en el medio acorde con la

invención deficitario en glucosa e inositol. Este enriquecimiento preliminar se consigue preferiblemente en dos etapas. En la primera etapa, una fracción de glóbulos blancos que contiene las células madre se separa de otros componentes de la sangre mediante lisis hipotónica de eritrocitos, seguida de centrifugado para la recogida del resto de las células, o mediante centrifugado de densidad de flotación para separación de la fracción celular mononuclear (que contiene células madre). En la segunda etapa, las células madre se enriquecen adicionalmente con estas poblaciones de glóbulos blancos mediante el enlace de anticuerpos que son selectivos para las poblaciones que contienen células madre (por ejemplo, anticuerpos hasta CD133 y/o CD34) o para poblaciones que no contienen células madre (por ejemplo, anticuerpos hasta CD38 y/o marcadores de linaje las poblaciones celulares específicas identificadas de esta forma se aíslan bien mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, que requiere la utilización de anticuerpos fluorescentes) o por clasificación celular mediante afinidad magnética (MACS). La identificación y el aislamiento de poblaciones enriquecidas con células madre mediante FACS también puede conseguirse utilizando tintes fluorescentes (como Rhodamine 123 y/o Hoechst 33342) o mediante la utilización de sustrato fluorescente para una enzima (por ejemplo, aldehído deshidrogenasa) que muestra características de tinto diferenciales en poblaciones enriquecidas con células madre y vaciadas de células madre. El enriquecimiento preliminar puede implicar una combinación de estos procedimientos. Tras un período de cultivo de 12 horas a 1 semana, y normalmente de 3 días, la fracción celular superviviente está muy enriquecida con células madre. Este enriquecimiento se debe especialmente al hecho de que la

mayor parte de las células no madre dependen de la glucosa como fuente de energía y del inositol (que puede obtenerse de la glucosa) para transmitir señales mediadas por receptor que respalden la supervivencia, la proliferación y la diferenciación. De este modo no crecerán, sino que morirán en el medio de acuerdo con la invención.

[0046] La invención también se refiere a un procedimiento para amplificación de las células madre que conservan la función de célula madre. El medio de acuerdo con la invención soporta la división simétrica en lugar de la amplificación asimétrica de las células madre. Las fracciones celulares enriquecidas con células madre, obtenidas preferiblemente mediante los procedimientos descritos anteriormente, se introducen en el medio de acuerdo con la invención (deficiente en glucosa e inositol), que se complementa con activadores del crecimiento de células madre (entre los ejemplos se encuentra los factores de crecimiento de las familias Wnt, Notch o Hedgehog, o sustancias que replican sus efectos). El cultivo a largo plazo durante períodos de más de 1 semana, normalmente de 4 a 12 semanas, respalda la amplificación de la población de células madre sin la acumulación de células diferenciadas.

[0047] La invención también se refiere a un procedimiento de purificación de células madre no cancerosas procedentes de células cancerosas, concretamente células madre no cancerosas procedentes de la sangre o de la médula ósea de un paciente con cáncer, especialmente leucemia. Esto se consigue aplicando los procedimientos descritos anteriormente a las células obtenidas a partir de la médula ósea o la sangre del paciente. Mediante el cultivo de las células en el medio de acuerdo con la invención, el material quedará exento de células leucémicas, conservando la función de las células

madre normales. Este efecto se deriva del hecho de que la transformación cancerosa (y sobre todo leucémica) se deriva parcialmente de las mutaciones que activan vías de señalización dependientes de la glicolisis y de la
5 señalización dependiente del inositol. Se espera entonces que las células madre y células progenitor cancerosas sean más dependientes de la glucosa y el inositol que las células madre no cancerosas. Por tanto, el cultivo de una mezcla de células madre cancerosas y no cancerosas en el medio de la
10 invención, tendrá como resultado el enriquecimiento de las células madre no cancerosas y la eliminación de las células cancerosas. A esto se le denomina el "purgado" de las células cancerosas.

[0048] Respectivamente, las fracciones celulares
15 enriquecidas o amplificadas están disponibles para su análisis experimental; el cultivo posterior en unas condiciones que respalden el desarrollo de células hematopoyéticas o de otro tipo (por ejemplo, en aplicaciones de diseño de tejidos); manipulación genética; y/o el
20 trasplante a pacientes. La fracción celular purgada de las células cancerosas proporciona una fuente de células madre para el trasplante autólogo de pacientes con cáncer, especialmente pacientes con leucemia.

[0049] Las ventajas de la invención se resumen como sigue:

25 Ventaja 1: los tipos de células diferenciados dependen de la señalización mediada por inositol para su supervivencia. Un medio deficiente en inositol y glucosa, por tanto, permite el enriquecimiento mediante supervivencia selectiva de células madre somáticas o células madre de línea
30 germinal procedentes de mezclas de células madre y células no madre. (Principal aplicación: aporte de fracciones celulares madre enriquecidas para la investigación y terapia).

Ventaja 2: En ausencia de glucosa e inositol, que llevan a la ausencia de señalización dependiente de inositol, las células madre somáticas o células madre de línea germinal no pueden generar células diferenciadas viables. Cuando se complementa con factores de crecimiento que respalden la proliferación de células madre mediante vías independientes del inositol, el medio permite la amplificación de las células madre sin pérdida de su potencial (principal aplicación - aumento del número de células madre disponibles para su trasplante, terapia génica, diseño de tejidos e investigación).

Ventaja 3: las células cancerosas suelen tener un metabolismo predominantemente glicolítico, por lo que no son capaces de sobrevivir y proliferar en medios exentos de glucosa, lo que proporciona una base para purificar selectivamente las células madre somáticas normales o células madre de línea germinal procedentes de tejido canceroso (Aplicación: purgado de médula ósea leucémica para la generación de trasplantes autólogos).

Ventaja 4: El cultivo en las condiciones descritas será importante, no sólo para amplificar células madre somáticas o germinales, sino también para mantener la integridad genética de las células. En unas condiciones estándar de cultivo celular en las que abunde la glucosa, el nivel energético de las células es elevado y abunda el inositol, y cualquier mutación que incremente las señales para la proliferación celular confiere a esa célula una ventaja selectiva, de forma que los descendientes de la célula mutada (que también transportan la mutación) superan progresivamente al resto de células. Esto proporciona una base para selección progresiva de células cancerosas en un medio de cultivo celular conocido por la técnica. En el medio de la invención, los niveles de

energía y la disponibilidad de inositol es baja, por lo que la tasa de proliferación se limita más por la actividad metabólica y menos por la señalización. Las mutaciones que aumentan potencialmente las señales de proliferación tendrán por tanto poco efecto. Por esta razón, se producirán pocas o ninguna selección de estas mutaciones potencialmente cancerígenas.

[0050] La invención puede ilustrarse mediante los siguientes ejemplos, sin limitarse a los mismos:

Ejemplo 1: Ejemplo de composición de un medio

[0051] Un medio basal adecuado comprende:

	Cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	218 mg/l,
15	Cloruro potásico (KCl)	330 mg/l,
	Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	200 mg/l,
	Cloruro sódico (NaCl)	4,5 g/l,
	Carbonato sódico de hidrógeno (NaHCO_3)	2,7 g/l,
20	Fosfato dihidrogenado de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	125 mg/l,
	HEPES	6 g/l,
	L-alanina	9 mg/l,
	L-asparagina	13 mg/l,
25	L-arginina.HCl	126 mg/l,
	L-aspartato	13 mg/l,
	L-cisteína	50 mg/l,
	L-glutamato	200 mg/l,
	Glicina	15 mg/l,
30	L-hisitidina.HCl.H ₂ O	40 mg/l,
	L-isoleucina	52 mg/l,
	L-leucina	52 mg/l,

	L-lisina.HCl	72 mg/l,
	L-metionina	15 mg/l,
	L-fenilalanina	32 mg/l,
	L-prolina	15 mg/l,
5	L-serina	20 mg/l,
	L-treonina	40 mg/l,
	L-triptófano	10 mg/l,
	L-tirosina	36 mg/l,
	L-valina	46 mg/l.

10

Vitaminas**[0052]**

15	Pantotenato	4 mg/l,
	Colina	4 mg/l,
	Ácido fólico	4 mg/l,
	Nicotinamida	4mg/l,
	Piridoxina	4 mg/l,
20	Riboflavina	0,05 mg/l,
	Tiamina	4 mg/l,
	Vitamina B12	0,013 mg/l.

Otros componentes

25

[0053]

	Fenol rojo, 15 mg/l,
	Nucleósidos, 25mg/l, de adenosina, citidina, guanosina y uridina,
30	Piruvato, 220 mg/l,
	Ácidos grasos esenciales 10 µg/L de ácido linoleico y ácido linolénico,

Ácidos grasos esenciales 10 µg/L de ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico,
Colesterol, 0,2 mg/l.

5 **[0054]** El medio basal se ajusta a una osmolaridad de 0,36, bien mediante disolución en agua esterilizada (para reducir la osmolaridad) o añadiendo cloruro sódico para aumentar la osmolaridad.

[0055] Antes de su utilización, el medio se complementa con los siguientes componentes:

- 10 • Suero equino dializado 10% v/v
• Selenita sódica 10 µg/L
• Glutathione 0,5mg/l
• L-glutamina 10 mg/l
• Interleucina-3 4000 u/l

15 **[0056]** El medio basal se ajusta a una osmolaridad de 0,36, bien mediante disolución en agua esterilizada (para reducir la osmolaridad) o añadiendo cloruro sódico para aumentar la osmolaridad.

20 Ejemplo 2: Ejemplo de un procedimiento de cultivo

[0057] Un ejemplo de un procedimiento de cultivo viene dado por el cultivo de las líneas celulares FDCPmix en el medio de acuerdo con el ejemplo 1, en comparación con el
25 cultivo en un medio estándar.

Descripción de las líneas celulares FDCPmix, procedimientos de cultivo conocidos y procedimientos de análisis:

[0058] Las células FDCPmix son líneas celulares progenitor tempranas hematopoyéticas multipotenciales, que se han
30 estudiado ampliamente como modelo para células madre hematopoyéticas (Spooncer y otros, 1993). Las células FDCPmix se han cultivado previamente en un medio IMDM, DMEM o de

Fischer estándar complementado con suero equino al 20% (no dializado) y 100u/ml de IL-3. El cultivo celular se ha llevado a cabo anteriormente a 37° C en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ en aire (en torno a un 20% de O₂, 75% de N₂). En estas condiciones, la población consiste en una mezcla de células multipotentes (tempranas) y células diferenciadoras (tardías).

[0059] La proporción de células multipotentes en una población FDCPmix dada puede calcularse dispersando un número conocido de células en un medio que contenga los mismos componentes que el utilizado para el mantenimiento de las células FDCPmix, pero semi-solidificado por la inclusión de metilcelulosa o agarosa fundida. Las células tempranas son capaces de llevar a cabo una amplia auto-renovación y formar colonias a lo largo de un período de 7 a 14 días de incubación a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire.

[0060] El potencial de diferenciación de las células en una población FDCPmix dada se determina trasladándolas a un medio estándar IMDM que contiene del 10 al 20% de suero fetal bovino, 1-2u/ml de IL-3, y factores adicionales de crecimiento que soporten el desarrollo de células mieloides (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) o células eritroides (eritropoyetina) (Kan y otros, 1993).

[0061] *Ejemplo de un procedimiento de cultivo que utiliza el medio de la invención:* las células FDCPmix se situaron en el medio descrito en el ejemplo 1 con una densidad de 5×10^4 células/ml, y se cultivaron en una atmósfera de 1% de O₂, 5% de CO₂, 94% de N₂. Cada 4 o 6 días, se determinaba el número de células vivas y muertas y se ajustaba la densidad celular a 5×10^4 células por ml bien mediante centrifugado celular, retirada del medio sobrenadante y sustitución por un volumen adecuado de nuevo medio (días 4, 8, 20, 24, 34, 38 y 42 del

cultivo) o simplemente añadiendo una cantidad adecuada de nuevo medio al cultivo (días 14 y 28 del cultivo).

[0062] *Resultados:* Como se muestra en la figura 1, la mayoría de las células de una población FDCPmix que se mantuvieron anteriormente en un medio que contenía glucosa e inositol y después se transfirieron al medio deficiente en glucosa e inositol murieron en los primeros 4 días de cultivo, demostrando que el medio es selectivo para una subpoblación de las células FDCPmix. Posteriormente, las células supervivientes proliferaron, obteniéndose un aumento constante del número de células vivas a lo largo del período de cultivo.

[0063] Esto demuestra que la población celular que sobrevive en el medio deficiente en glucosa e inositol es capaz de una proliferación a largo plazo a lo largo de un período de al menos 6 semanas. En las condiciones de este experimento, la población que prolifera produjo una proporción sustancial de células que mueren, demostrando que la proliferación de dichas células "tempranas" independientes de la glucosa y el inositol no sólo produce más células con las mismas propiedades, sino también un importante número de células "tardías" que dependen de la glucosa y/o el inositol y que por tanto se eliminan del cultivo.

Ejemplo 3 Aislamiento y enriquecimiento de células madre procedentes de la sangre del cordón umbilical

[0064] *Pre-enriquecimiento:* El pre-enriquecimiento utiliza procedimientos considerados como estándar en la investigación hematológica. Partiendo de un volumen de 50 ml de sangre humana procedente del cordón umbilical, la fracción celular mononuclear que contiene células madre hematopoyéticas se purifica del resto de componentes de la médula ósea por

centrifugado de gradiente de densidad en un medio Ficoll-Paque® (polímero sintético no iónico de sucrosa) u otro medio de centrifugado similar. La fracción mononuclear se lava en una solución salina con tampón de fosfato, recuperándose por centrifugado. La subpoblación de células mononucleares que expresa el antígeno superficial CD34 se aíslan mediante un procedimiento de afinidad magnética utilizando el Kit MACS® CD34 Kit (Miltenyi Biotech) en las condiciones recomendadas por el fabricante. En resumen, la población de células mononucleares se vuelve a suspender a una concentración de 3×10^8 células por ml, se incuban con lechos magnéticos que incorporen anticuerpos del antígeno superficial CD34, se aplican después a una columna dispuesta en un campo magnético, de forma que se retienen las células ligadas a partículas (CD34+), y las células no ligadas se eluyen y descartan. La población CD34+ se eluye de la columna tras la retirada del campo magnético.

[0065] *Enriquecimiento adicional en el medio de la invención:* la población CD34+ se transfiere a una concentración celular de 1×10^5 células por ml en el medio de la invención, complementándose con un suero humano autólogo dializado al 10%, incubándose a 37° C en una atmósfera de un 1% de O₂, 5% de CO₂ y 94% de N₂.

[0066] Tras un período de tres a siete días, la población de células supervivientes se enriquece en células madre y células progenitor tempranas, pudiendo recuperarse por centrifugado.

Ejemplo 4 Purificación de células madre no leucémicas procedentes de células leucémicas en una muestra de médula ósea procedente de un paciente con leucemia

[0067] La fracción mononuclear de células CD34+ procedente de una muestra de médula ósea humana se pre-enriquece utilizando los procedimientos estándar de centrifugado de gradiente de densidad y afinidad magnética descritos en el ejemplo 3. La población CD34+, que normalmente contiene una mezcla de células madre y progenitor leucémicas y células madre y progenitor normales, se transfiere a una concentración celular de 1×10^5 células por ml al medio de la invención, suplementado mediante suero humano autólogo dializado al 10%, incubándose a 37° C en una atmósfera de un 1% de O₂, 5% de CO₂ y 94% de N₂.

[0068] Tras un período de tres a siete días, la población de células supervivientes se enriquece en células madre y células progenitor tempranas normales, vaciándose de células madre y células progenitor leucémicas, pudiendo recuperarse por centrifugado.

Referencias

[0069]

Hofmeister, C.C., Zhang, J., Knight, K.L., Le, P. And Stiff, P.J. (2007) Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. Bone Marrow Transplantation, 39 (1) pp11-23.

Kan, O., Whetton, A.D. and Heyworth, C.M. (1993) Development of haematopoietic cells I liquid culture. En "Haemapoiesis a practical approach" ed.N.G. Testa and G. Molineux, Oxford University Press, Oxford. ISBN 0-19-963366-5 pp123-137 .

Spooncer, E., Boettinger, D. and Dexter, T.M. (1993) Isolation and culture of factor-dependent haematopoietic cell lines. In "Haemapoiesis a practical approach" ed.N.G. Testa

and G. Molineux, Oxford University Press, Oxford. ISBN 0-19-963366-5. pp107-121.

Wilson, A. and Trumpp, A. (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol., 6, 93-106 .

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un medio de cultivo celular que contiene menos de 500 mg/l de glucosa y menos de 500 µg/l de inositol, que comprende un medio basal suministrado como una solución diluida, una solución concentrada o un polvo que contiene menos de 500 mg/l de glucosa y menos de 500 µg/l de inositol, respecto de la solución final diluida, para cultivar, amplificar, purificar y/o enriquecer células madre somáticas o células madre de línea germinal.

2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medio basal contiene menos de 100 mg/l de glucosa y menos de 100 µg/l de inositol, respecto de la solución final diluida.

3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el medio basal contiene menos de 10 mg/l de glucosa y menos de 10 µg/l de inositol, respecto de la solución final diluida.

4. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el medio basal contiene menos de 200 mg/l de L-glutamina y entre 10 mg/l y 500 mg/l de L-glutamato, respecto de la solución final diluida.

5. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el medio basal contiene entre 10 mg/l y 200 mg/l de L-serina y entre 5 mg/l y 100 mg/l de glicina y/o entre 5 mg/l y 100 mg/l de L-cisteína, respecto de la solución final diluida.

6. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el medio basal contiene adicionalmente entre 1 mg/l y 1 g/l de nucleósidos o precursores de nucleósidos, respecto de la solución final diluida.

7. Utilización de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el medio basal contiene entre 1 mg/l y 50 mg/l de cada compuesto elegido de adenosina, guanosina, citidina y uridina.

5 8. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el medio de cultivo celular se complementa bien mediante un suero o bien mediante un componente sustitutivo del suero.

10 9. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el componente de sustitución del suero comprende albúmina, selenio, transferrina y ácidos grasos esenciales.

10 10. Utilización de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que el contenido de glucosa e inositol en el suero debe reducirse mediante diálisis y/o tratamiento enzimático.

15 11. Utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el medio de cultivo celular se complementa mediante factores de crecimiento que respaldan el desarrollo de células madre, otros activadores y/o inhibidores de vías de señalización celular.

20 12. Procedimiento de cultivo, amplificación, purificación y/o enriquecimiento de células madre somáticas o células madre de línea germinal en el que las células se cultivan *in vitro* en un medio de cultivo celular como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 11.

25 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que las células se cultivan en una atmósfera que contiene entre el 0,1% y el 5% de O₂.

30 14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que las células madre se enriquecen a partir de sangre y/o médula ósea.

15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la sangre y/o médula ósea se aíslan a partir de un paciente con cáncer o leucemia.

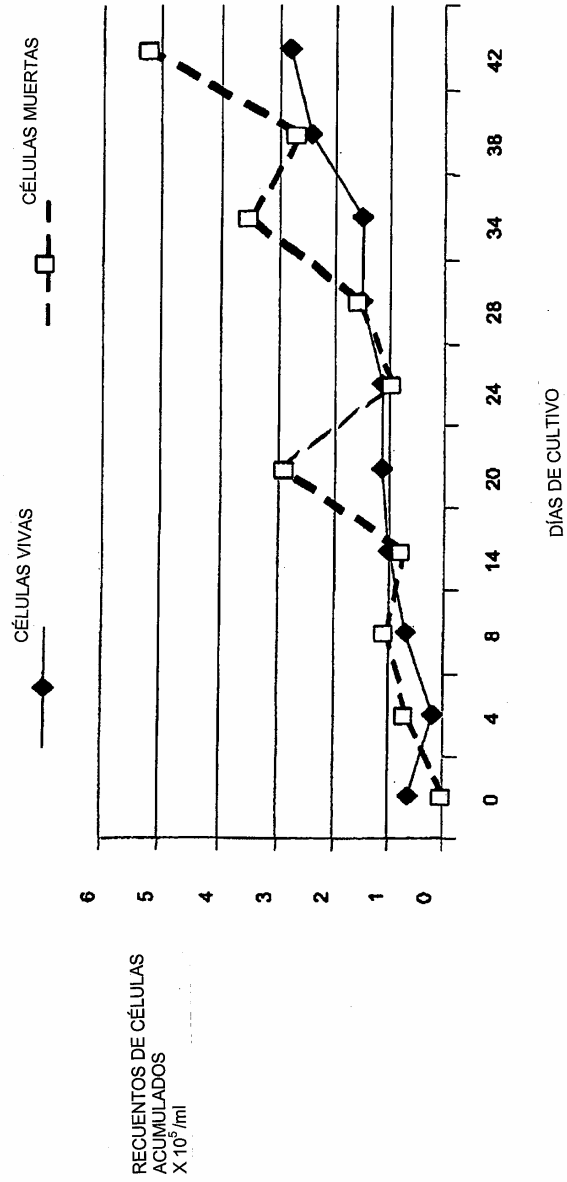


Fig. 1

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- US 5747341 A [0009]

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- **Stolzing et al.** *Rejuvenation Research*, 2006, vol. 9 (1), 31-35 [0010]
- **Hofmeister, C.C. ; Zhang, J. ; Knight, K.L. ; Le, P. ; Stiff, P.J.** Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplantation*, 2007, vol. 39 (1), 11-23 [0069]
- Development of haematopoietic cells I liquid culture. **Kan, O. ; Whetton, A.D. ; Heyworth, C.M.** Haemapoiesis a practical approach. Oxford University Press, 1993, 123-137 [0069]
- Isolation and culture of factor-dependent haematopoietic cell lines. **Sponcer, E. ; Boettinger, D. ; Dexter, T.M.** Haemapoiesis a practical approach. Oxford University Press, 1993, 107-121 [0069]
- **Wilson, A. ; Trumpp, A.** Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.*, 2006, vol. 6, 93-106 [0069]