

MÉTODOS PARA ALMACENAR CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional
5 estadounidense N.º 63/158.267 presentada el 8 de marzo de 2021, que se incorpora
en la presente por referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente divulgación se refiere a métodos para el almacenamiento hipóxico
de células madre. La presente divulgación también se refiere a métodos para el
10 preacondicionamiento de células madre. La presente divulgación se refiere además a
métodos para almacenar células madre en dispositivos hipóxicos. La presente
divulgación se refiere además a métodos para el cultivo y proliferación hipóxicos de
células madre de sangre de cordón umbilical humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0003] Las células madre son la base de todas las partes del cuerpo humano. Este
proceso de desarrollo de células madre a tejido, órganos y células sanguíneas es
complejo e impredecible. Uno de los factores implicados en este proceso complejo es
el oxígeno.

[0004] Los estudios han demostrado que las células madre residen en microentornos
20 en los que están expuestas a diferentes concentraciones de oxígeno, lo que tiene un
rol significativo en su biología, mantenimiento, diferenciación y respuestas a diferentes
señales de estrés. Ver Abdollahi H, *et al.*, "The role of hypoxia in stem cell
differentiation and therapeutics" *J Surg Res*, 165(1):112-117 (2011); y Drela K,
Sarnowska A, *et al.*, Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains
25 undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible
factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16:881-892 (2014).

[0005] En condiciones fisiológicas normales, se cree que las HSC se mantienen en un
estado inactivo y proliferativo relativamente bajo, protegidas del estrés, tal como
acumulación de especies de oxígeno reactivas (ROS) y daño del ADN, lo que evita su
30 disminución causada por proliferación excesiva. Ver Mas-Bargues C, *et al.* "Relevance
of Oxygen Concentration in Stem Cell Culture for Regenerative Medicine" *Int. J. Mol.
Sci.*, 20 (1195):1-27 (2019); Simon, M.C. y Keith, B. "The role of oxygen availability in
embryonic development and stem cell function" *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 285–296
(2008); Bigarella C L, y Liang R, Ghaffari S. "Stem cells and the impact of ROS
35 signaling" *Development*, 141:4206-4218 (2014); Lee J, *et al.*, "Pharmacological

regulation of oxidative stress in stem cells” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-13 (2018). En la actualidad, existe consenso en que el oxígeno sirve como un sustrato metabólico y como molécula de señalización para células *in vitro* e *in vivo*. Ver Mohyeldin A, *et al.* “Oxygen in stem cell” *Cell Stem Cell*. 7:150-161 (2010).

- 5 **[0006]** En ciertos tipos de células madre adultas, la baja concentración de oxígeno *in vitro* promueve la proliferación y el mantenimiento de un estado multipotente. Grayson WL, *et al.* “Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells” *Biochem Biophys Res Comm*. 358:948–953 (2007); y Csete M. “Oxygen in the cultivation of stem cells” *Ann NY Acad Sci*. 1049:1–8 (2005). A la
- 10 inversa, otros investigadores demostraron que la hipoxia es un estímulo potente para la diferenciación en líneas de células específicas. Koay EJ, *et al.*, “Hypoxic chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells enhances cartilage protein synthesis and biomechanical functionality” *Osteoarthritis and Cartilage*. 10:1–7 (2008); y Khan WS, *et al.*, “Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor
- 15 2α and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients” *Arthritis Research Ther*. 9:1–9 (2007). Alternativamente, la hipoxia puede estimular la producción de citocinas, lo que cumple potencialmente una función en la angiogénesis terapéutica. Ver Thangarajah H, *et al.* “IFATS Series: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia”
- 20 *Stem Cells*. 27:266–274 (2009); Sadat S, *et al.* “The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-1 and VEGF” *Bioch Biophys Res Comm*. 363:674–679 (2007); y Rehman J, *et al.* “Secretion of angiogenic and anti-apoptotic factors by human adipose stromal cells” *Circulation*. 109:1292–1298 (2004). La participación en la angiogénesis de células madre puede tener lugar directamente
- 25 mediante la diferenciación de células que participan en la angiogénesis, o indirectamente mediante producción de citocinas estimulada por hipoxia. Ver Cao Y, *et al.* “Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*” *Biochem Biophys Res Comm*. 332:370–379 (2005); y Nakagami H, *et al.* “Adipose tissue-derived stromal cells as a
- 30 novel option for regenerative cell therapy” *J Atheroscler Thromb*. 13:77–81 (2006). Cuando se cultivan células madre en un nivel de oxígeno que no es el mismo que el ofrecido por el microentorno nicho, la células son sometidas a un conjunto de alteraciones, tales como estrés oxidativo, recambio metabólico, proliferación reducida y autorrenovación, motilidad dificultada, potencial diferenciación alterada y pérdida
- 35 potencial de *stemness*. Todas estas consecuencias se pueden evitar si las células

madre se cultivan en sus niveles de oxígeno fisiológicos.

[0007] En la presente, se demuestran dispositivos y métodos para mantener células madre en un estado hipóxico durante el almacenamiento y la expansión de células madre. Este estado hipóxico proporciona una calidad mejorada de las células madre para su trasplante a pacientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0008] La presente divulgación proporciona e incluye métodos para preparar células madre para su trasplante a un paciente que lo necesite que comprende: recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno que comprende un recipiente de recolección hipóxica que comprende un aislante de oxígeno (O_2) caracterizado por una permeabilidad al oxígeno O_2 menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno; mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%, separar los leucocitos y las células madre del hemoderivado, lo que comprende pasar el hemoderivado por un filtro en donde las células madre y los leucocitos se retienen en el filtro para preparar un hemoderivado con disminución de leucocitos y células madre; eluir las células madre del filtro con un medio isotónico; y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O_2 caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O_2) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día para preparar células madre hipóxicas almacenadas.

[0009] La presente divulgación también proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su transfusión que comprenden: recolectar un hemoderivado que comprende células madre; separar los leucocitos y las células madre del hemoderivado; transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O_2 caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O_2) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día, y almacenar las células madre en un entorno hipóxico de menos de 3500 Pa durante un período de tiempo a una temperatura menor de 37°C.

[0010] La presente divulgación también proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden: recolectar sangre de cordón umbilical humano (HUCB); separar los leucocitos y las células madre de la HUCB al pasar la HUCB por un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre; eluir las células madre del filtro de retención de células madre con un medio isotónico; y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento

hipóxico.

[0011] La presente divulgación también proporciona e incluye kits para procesar las células madre para su trasplante que comprenden: un recipiente de recolección hipóxica; un filtro de leucocitos y recuperación de células madre; un primer recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio para recolectar el sobrenadante filtrado; un
5 segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio que comprende un medio de mantenimiento de células madre; en donde el segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio está en comunicación fluida con el filtro de leucocitos y recuperación de células madre, en donde la comunicación fluida
10 comprende una presión parcial de oxígeno (pO_2) menor de 1,400 pascales (Pa).

[0012] La presente divulgación también proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden: exponer un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas almacenadas congeladas a 37°C; sumergir la bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende
15 células madre hipóxicas almacenadas congeladas en un baño de agua a menos de 42°C para descongelar las células madre hipóxicas almacenadas congeladas con el fin de generar células madre descongeladas; diluir las células madre descongeladas con un volumen igual de solución hipóxica que contiene 2,5% (peso/vol) de albúmina humana para formar células madre diluidas.

[0013] La presente divulgación también proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden: exponer una bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas almacenadas congeladas a al menos 25°C para formar células madre hipóxicas almacenadas descongeladas; centrifugar las células madre hipóxicas almacenadas descongeladas y
25 retirar el sobrenadante; y volver a suspender las células madre hipóxicas almacenadas en una solución que comprende 3% de dextrano 40, en donde la bolsa de almacenamiento hipóxico comprende un entorno hipóxico de menos de 3500 Pa.

[0014] La presente divulgación también proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante en un sujeto que lo necesite que comprende:
30 descongelar las células madre hipóxicas preparadas; expandir las células madre en un sistema de expansión de células madre hipóxicas; y trasplantar las células madre expandidas al sujeto que lo necesite.

[0015] La presente divulgación proporciona e incluye además métodos para preparar las células para su trasplante que comprenden recolectar un hemoderivado que
35 contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno que comprende un

recipiente de recolección hipóxica, en donde el recipiente de recolección hipóxica comprende un aislante de oxígeno (O_2) caracterizado por una permeabilidad al O_2 menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno; mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%; separar los leucocitos y las células madre del hemoderivado, lo que comprende pasar el hemoderivado por un filtro de unión de células madre para preparar un hemoderivado con disminución de leucocitos y células madre; eluir las células madre del filtro con un medio isotónico; y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende una bolsa interna compatible con células que comprende un material que tiene una permeabilidad al oxígeno (O_2) mayor de 25 Barrer y formar células madre hipóxicas almacenadas, en donde las células madre no se exponen a condiciones normóxicas durante más de una hora entre la recolección y la transferencia, en donde las condiciones normóxicas comprenden una presión parcial de oxígeno de al menos alrededor de 21,000 pascales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] Algunos aspectos de la divulgación se describen en la presente, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica a los dibujos en detalle, se destaca que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las formas de realización de la divulgación. En este sentido, la descripción, considerada en conjunto con los dibujos, hace que las personas del oficio de nivel medio sepan cómo pueden ponerse en práctica los aspectos de la divulgación.

[0017] La Figura 1 es un esquema para la recolección y concentración de células madre mediante el uso de tecnología de filtración, de acuerdo con un aspecto de la presente memoria descriptiva. El esquema muestra (A) una bolsa de almacenamiento hipóxico que contiene sangre de cordón umbilical humano anticoagulada, (B) una bolsa de almacenamiento hipóxico que contiene sangre de cordón umbilical humano después de la filtración, y (C) una bolsa de almacenamiento hipóxico para recolectar las células madre recuperadas.

[0018] La Figura 2 es un esquema de un recipiente de expansión hipóxica de células madre como se proporciona en un aspecto de la presente memoria descriptiva.

[0019] Los ejemplos presentados en la presente ilustran varias formas de realización de la invención, pero de ningún modo deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos como se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona del oficio de nivel medio. Una persona del oficio de nivel medio reconocerá que se pueden usar muchos métodos en la práctica de la presente divulgación. De hecho, la presente divulgación no está limitada de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Cualquier referencia citada en la presente se incorpora por referencia en su totalidad. A los fines de la presente divulgación, las siguientes expresiones se definen a continuación.

5 **[0021]** Como se usa en la presente, la expresión “alrededor de” se refiere a $\pm 10\%$.

[0022] Las expresiones “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, entre otros”.

[0023] La expresión “que consiste en” significa “que incluye y se limita a”.

10 **[0024]** La expresión “que consiste esencialmente en” significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero sólo si los ingredientes, las etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicada.

15 **[0025]** Como se usan en la presente, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluso mezclas de estos.

20 **[0026]** En esta solicitud, diversas formas de realización de la presente divulgación se pueden presentar en un formato de rangos. En consecuencia, la descripción de un rango debe considerarse que ha divulgado específicamente todos los subrangos posibles así como también valores numéricos individuales dentro de ese rango. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango. Como se usa en la presente, “entre” significa que el rango incluye todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango, pero sin incluir los valores externos. Por ejemplo, “entre 1 y 7” no incluye los valores 1 o 7 y entre “0 y 7” no incluye los valores 0 o 7.

25 **[0027]** Como se usa en la presente, el término “método” se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea determinada que incluye, entre otras, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos que los profesionales en la técnica de la química, farmacología, biología, bioquímica y medicina conocen o pueden

desarrollar a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos.

[0028] Como se usa en la presente, el término “bolsa” se refiere a recipientes plegables preparados a partir de un material flexible e incluye bolsas, tubos y bolsas con fondo reforzado. En ciertos aspectos, una bolsa se refiere a un recipiente no plegable. Como se usa en la presente, y se incluye en la presente divulgación, el término “bolsa” incluye bolsas plegadas que tienen uno, dos, tres o más pliegues y que están selladas o unidas en uno, dos, tres o más lados. Las bolsas se preparan con una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen la unión de láminas de uno o más materiales. Los métodos para unir materiales para formar bolsas son conocidos en la técnica. Ver la publicación internacional N.º WO 2016/145210. También se incluyen y se proporcionan en la presente divulgación recipientes preparados mediante moldeo por inyección y moldeo por soplado. Los métodos para preparar recipientes moldeados por soplado y moldeados por inyección son conocidos en la técnica. Ver las patentes estadounidenses N.º 4,280,859; y 9,096,010. Los tipos preferidos de recipientes moldeados por soplado o moldeados por inyección son recipientes flexibles que pueden reducirse en tamaño para un envasado y envío eficientes y, a su vez, ser capaces de expandirse para acomodar sangre o componentes sanguíneos para la reducción de oxígeno. También pueden estar diseñados para ajustarse al volumen de la sangre hasta que estén completamente expandidos. Como se usa a lo largo de la presente divulgación, las bolsas son una forma de recipiente plegable y los dos términos se usan indistintamente a lo largo de la presente divulgación.

[0029] Como se usa en la presente, el término “normóxico” o la expresión “condiciones normóxicas” se refiere a hemoderivados o un entorno que tiene un nivel de oxígeno no disminuido. En un aspecto, normóxico o condiciones normóxicas se refieren a una presión parcial de oxígeno de al menos 21,000 Pa. Como se usa en la presente, el término “medioóxico” o la expresión “condiciones medioóxicas” se refiere a hemoderivados o un entorno que tiene un nivel de oxígeno no disminuido y un ingreso de oxígeno mínimo. En un aspecto, medioóxico o condiciones medioóxicas se refieren a una presión parcial de oxígeno de al menos 13,000 Pa. En otro aspecto, medioóxico o condiciones medioóxicas se refieren a una presión parcial de oxígeno de entre 13,000 Pa y 20,000 Pa. Como se usa en la presente, el término “hipóxico” o la expresión “condiciones hipóxicas” se refiere a hemoderivados o un entorno que tiene un nivel de oxígeno disminuido. En un aspecto, hipóxico o condiciones hipóxicas se refiere a una presión parcial de oxígeno menor de 12,000 Pa. En otro aspecto,

hipóxico o condiciones hipóxicas se refiere a entre 400 y 12,000 Pa. En aun otro aspecto, hipóxico o condiciones hipóxicas se refiere a entre 2,000 y 10,000 Pa, 3,000 y 10,000 Pa, 4,000 y 10,000 Pa, 2,000 y 12,000 Pa, 3,000 y 12,000 Pa, o 4,000 y 12,000 Pa.

- 5 **[0030]** Como se usa en la presente, los términos “sangre” y “hemoderivado” se refieren a sangre periférica, sangre de cordón umbilical humano (HUCB) y médula ósea que contienen células madre. La temperatura de la sangre varía con la etapa del proceso de recolección, ya que empieza a la temperatura normal del cuerpo de 37°C al momento y punto de recolección, pero disminuye rápidamente a alrededor de 30°C
- 10 una vez extraída del cuerpo del paciente. Una unidad de sangre recolectada se enfría hasta temperatura ambiente en alrededor de 6 horas cuando se deja sin tratar. En la práctica, la sangre para transfusión se procesa dentro de 24 horas y se refrigera a entre alrededor de 2°C y 6°C, habitualmente 4 °C.

- [0031]** Como se usa en la presente, la expresión “célula madre sanguínea” o “célula madre” se refiere a una célula inmadura que puede desarrollarse hasta volverse cualquier tipo de célula sanguínea, incluso glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Las células madre sanguíneas también se denominan células madre hematopoyéticas. Las células madre sanguíneas se encuentran en, y se extraen de,
- 15 sangre de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica de un donante.

- 20 **[0032]** Las células madre son células no diferenciadas o células parcialmente diferenciadas con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células y dividirse indefinidamente para producir estas. Estas células hijas se vuelven nuevas células madre (autorrenovación) o se transforman en células especializadas (diferenciación) con una función más específica, tales como células sanguíneas, células cerebrales,
- 25 células de músculo cardíaco o células óseas. Ver Morrison SJ, *et al.*, Regulatory mechanisms in stem cell biology, *Cell*, 88: 287–298 (1997) (Morrison 1997); y Reubinoff BE, *et al.*, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*, *Nat. Biotechnol*, 18: 399–404 (2000) (Reubinoff 2000) (incorporadas en la presente por referencia en su totalidad).

- 30 **[0033]** Sin pretender limitarse a la teoría, la evidencia reciente demuestra que se pueden emplear células madre para repoblar muchos o lo totalidad de los tejidos y restaurar las funcionalidades fisiológica y anatómica. En consecuencia, las células madre tienen el potencial de ser usadas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y lesiones, incluso traumatismos del sistema nervioso, neoplasias,
- 35 enfermedades genéticas, hemoglobinopatías e inmunodeficiencia. Generalmente, las

células madre se dividen en dos tipos: células madre embrionarias (ES) y células madre adultas (AS). Las células madre embrionarias se preparan a partir de embriones que tienen de tres a cinco días de edad. En esta etapa, el embrión se denomina blastocisto y tiene alrededor de 150 células. Ver Morrison 1997 y Reubinoff
5 2000. Se entiende que las células ES son totipotentes.

[0034] Las células madre adultas pueden reponer rápidamente tipos de células perdidos a través del ciclo de muerte celular natural, lesión o enfermedad. Las células madre adultas pueden diferenciarse en unos pocos tipos celulares (pluripotentes o multipotentes) o pueden limitarse a un tipo celular (unipotente).

10 **[0035]** Una clase de células madre pluripotentes son las células madre hematopoyéticas (HSC) que son responsables de reponer las células sanguíneas e inmunitarias. Las células madre hematopoyéticas (HSC) son las células madre multipotentes, que pueden generar todos los tipos de células sanguíneas, incluso los linajes mieloides (monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos,
15 megacariocitos/plaquetas y células dendríticas) y linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células NK). Las células madre adultas están superadas ampliamente por las células de progenie y células diferenciadas terminalmente en las que se diferencian. Ver McKee C, *et al.*, Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surf B: Biointerfaces*, 159:62-77 (2017) y Bieniasz M, *et al.* Stem cell general characteristics
20 and sources. *MEDtube Science*, 2:8-14 (2014) (incorporadas en la presente por referencia en su totalidad).

[0036] Las células madre adultas se pueden alterar para que tengan más de las propiedades totipotentes de las células madre embrionarias, y se denominan células pluripotentes inducidas (iPSC). Las tres fuentes donantes principales de las células
25 madre adultas son la médula ósea, el tejido adiposo y la sangre periférica. La sangre de cordón umbilical humano (HUCB) también es una fuente rica de células madre adultas, incluso células madre hematopoyéticas (HSC), células madre mesenquimales (MSC) y otras células progenitoras. Las células madre hematopoyéticas y progenitoras (HSPC), así como algunas células maduras, expresan un antígeno en su superficie
30 denominado CD34, y el CD34 se usa ampliamente como un identificador de células madre hematopoyéticas y se lo usó como un requisito de dosis en protocolos para el trasplante de células madre.

[0037] La presente divulgación proporciona e incluye células madre hematopoyéticas que comprenden uno o más marcadores de células madre hematopoyéticas
35 seleccionados del grupo que consiste en la proteína de dedo anular 4 de grupo

Polycomb (BMI-1), cúmulo de diferenciación 21 (CD21), cúmulo de diferenciación 22 (CD22), cúmulo de diferenciación 34 (CD34), cúmulo de diferenciación 38 (CD38), cúmulo de diferenciación 41 (CD41), cúmulo de diferenciación 44 (CD44), cúmulo de diferenciación 45 (CD45), cúmulo de diferenciación 48 (CD48), cúmulo de diferenciación 90 (CD90; Thy 1), cúmulo de diferenciación 105 (CD105), cúmulo de diferenciación 106 (CD106), cúmulo de diferenciación 117 (CD117; kit c), cúmulo de diferenciación 127 (CD127), cúmulo de diferenciación 150 (CD150), c-myc, receptor de la proteína endotelial c (EPCR), antígeno de linfocito 6 (Ly6A/E; sca-1), MYB, proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida (Mcl-1), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), Skp, culina, caja F (SCF; ligando de kit), transductor y activador único de la transcripción 5a (STAT5a), transductor y activador único de la transcripción 5b (STAT5b) y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2). En otro aspecto, las células madre hematopoyéticas comprenden dos o más marcadores de células madre hematopoyéticas seleccionados del grupo que consiste en la proteína de dedo anular 4 de grupo Polycomb (Bmi-1), cúmulo de diferenciación 21 (CD21), cúmulo de diferenciación 22 (CD22), cúmulo de diferenciación 34 (CD34), cúmulo de diferenciación 38 (CD38), cúmulo de diferenciación 41 (CD41), cúmulo de diferenciación 44 (CD44), cúmulo de diferenciación 45 (CD45), cúmulo de diferenciación 48 (CD48), cúmulo de diferenciación 90 (CD90; Thy 1), cúmulo de diferenciación 105 (CD105), cúmulo de diferenciación 106 (CD106), cúmulo de diferenciación 117 (CD117; kit c), cúmulo de diferenciación 127 (CD127), cúmulo de diferenciación 150 (CD150), c-myc, receptor de la proteína endotelial c (EPCR), antígeno de linfocito 6 (Ly6A/E; sca-1), MYB, proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida (Mcl-1), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), Skp, culina, caja F (SCF; ligando de kit), transductor y activador único de la transcripción 5a (STAT5a), transductor y activador único de la transcripción 5b (STAT5b) y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2).

[0038] En un aspecto, la presente divulgación proporciona e incluye células madre que son células madre mesenquimales (MSC) que comprenden uno o más marcadores de células madre mesenquimales seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD90, CD105, CD106, CD166 y Stro-1. En otro aspecto, la presente divulgación proporcionan células madre mesenquimales (MSC) que comprenden dos o más marcadores de células madre mesenquimales seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD90, CD105, CD106, CD166 y Stro-1. En aun otro aspecto,

células madre mesenquimales (MSC) que comprenden tres o más marcadores de células madre mesenquimales seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD90, CD105, CD106, CD166 y Stro-1. En otro aspecto, las células madre hematopoyéticas comprenden uno o más marcadores de células madre hematopoyéticas seleccionados del grupo de proteínas del grupo Polycomb que consiste en Bmi1, Mel18, Rae28, Cbx2, Cbx8, Ring1B, Ezh1, Ezh2, Eed y Suz12. Ver Takamatsu-Ichihara, E. y Kitabayashi, I., "The roles of Polycomb group proteins in hematopoietic stem cells and hematological malignancies" *Intern Jour. Of Hematology*. 103, 634-642 (2016).

[0039] La presente divulgación proporciona e incluye un método para preparar células madre en una condición hipóxica durante la recolección y concentración para mejorar la calidad y el potencial proliferativo de las células madre. Más específicamente, los métodos de la presente divulgación proporcionan la exclusión de oxígeno durante las etapas de recolección y expansión.

[0040] En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para preparar las células madre para su trasplante a un paciente que lo necesite que comprenden recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno que tiene una baja presión parcial de oxígeno, mezclar el hemoderivado para reducir el oxígeno, separar los leucocitos y las células madre del hemoderivado, y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico. En un aspecto, las células madre se almacenan por hasta 3 días a temperatura ambiente. En otro aspecto, las células madre se almacenan por al menos 1 día a temperatura ambiente. En otro aspecto, las células madre se almacenan congeladas. En otro aspecto, las células madre se trasplantan a un paciente que necesita un trasplante de células madre. La temperatura ambiente es de entre 20 y 22°C. La temperatura ambiente es de entre 19 y 25°C. La temperatura ambiente es de al menos 20°C. La temperatura ambiente es menor de 22°C. La temperatura ambiente es de entre 20 y 23°C. La temperatura ambiente es de entre 19 y 22°C. En otro aspecto de la presente divulgación, las células madre se almacenan a temperatura ambiente durante menos de 7 días. En otro aspecto, las células madre se almacenan a temperatura ambiente de 1 a 7 días. En otro aspecto, las células madre se almacenan a temperatura ambiente durante al menos 1 día, al menos 3 días, al menos 5 días, y al menos 7 días. En otro aspecto, las células madre se almacenan a 4°C de 1 a 7 días, 1 a 3 días, 1 a 5 días, 1 a 14 días, 2 a 7 días, 2 a 8 días, 4 a 7 días, 5 a 10 días, o 3 a 14 días. En otro aspecto, las células madre se almacenan a 4°C durante menos de 14 días, menos de 10 días, menos de 7 días, menos de 5 días, y menos de 3 días. En aun otro aspecto,

las células madre se almacenan a 4°C durante al menos 1 día, al menos 3 días, al menos 5 días, al menos 7 días, y al menos 10 días.

[0041] La presente divulgación proporciona e incluye un método para preparar las células madre para su trasplante a un paciente que lo necesite que comprende recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbente de oxígeno que comprende un recipiente de recolección hipóxica que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al O₂ menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno, mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial de oxígeno (pO₂) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%, separar los leucocitos y las células madre de dicho hemoderivado al pasar el hemoderivado por un filtro de unión de células madre y leucocitos para producir un hemoderivado con disminución de células madre y un filtro unido a células madre a una baja presión parcial de oxígeno. Las células madre se eluyen del filtro con un medio isotónico y se transfieren a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al oxígeno menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día para preparar células madre hipóxicas. Las células madre se pueden almacenar a temperaturas menores de 37°C en condiciones hipóxicas para preparar células madre hipóxicas almacenadas.

[0042] La presente divulgación proporciona e incluye un método para preparar las células madre para su transfusión que comprende recolectar un hemoderivado que comprende células madre, separar los leucocitos y las células madre de dicho hemoderivado, transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al O₂ menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día, y almacenar dichas células madre en un entorno hipóxico durante un periodo de tiempo a una temperatura de 37°C o menos.

[0043] La presente divulgación proporciona e incluye un método para preparar las células madre para su trasplante que comprende recolectar sangre de cordón umbilical humano (HUCB), separar los leucocitos y las células madre de dicha HUCB al pasar la UCB por un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre, eluir dichas células madre de dicho filtro de retención de células madre con un medio isotónico, y transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico.

[0044] La presente divulgación proporciona e incluye un método para preparar las células madre para su trasplante que comprende recolectar sangre de cordón umbilical

humano (HUCB), separar los leucocitos y las células madre de dicha HUCB al pasar la UCB por un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre, eluir dichas células madre de dicho filtro de retención de células madre con un medio isotónico; y transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento
5 medioóxico, en donde el recipiente de almacenamiento medioóxico impide el ingreso de oxígeno.

[0045] En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar las células madre para su trasplante a un paciente que necesita un trasplante de células madre. En otro aspecto, un paciente que lo necesite es una persona que
10 tiene cáncer o una enfermedad del sistema inmunitario. En otro aspecto, un paciente que lo necesite y que necesite un trasplante de células madre es un paciente que tiene una neoplasia maligna o no maligna de sangre o médula ósea. En aun otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), anemia aplásica y
15 hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, macroglobulinemia de Waldenstrom, cáncer de testículo, trastornos congénitos de producción de sangre (por ejemplo, anemia de células falciformes, talasemia), anemia de Diamond-Blackfan (DBA), síndrome de Shwachman-Diamond (SDS), síndromes de disqueratosis congénita, o un trastorno autoinmunitario. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células
20 madre es una persona que tiene leucemia linfoblástica aguda (ALL). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene leucemia mieloide aguda (AML). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene anemia aplásica. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene leucemia linfocítica crónica (CLL). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células
30 madre es una persona que tiene leucemia mielógena crónica (CML). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene linfoma de Hodgkin. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene linfoma no Hodgkin. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene mieloma múltiple. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células
35

madre es una persona que tiene síndrome mielodisplásico. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene macroglobulinemia de Waldenstrom. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene cáncer de testículo. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene trastornos congénitos de producción de sangre (por ejemplo, anemia de células falciformes, talasemia). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene anemia de Diamond-Blackfan (DBA). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene síndrome de Shwachman-Diamond (SDS). En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene síndromes de disqueratosis congénita. En otro aspecto, una persona que necesita un trasplante de células madre es una persona que tiene un trastorno autoinmunitario. En un aspecto, la presente divulgación proporciona e incluye un volumen de células madre adecuado para su trasplante a un paciente que lo necesite. En otro aspecto, un volumen adecuado para el trasplante es de entre 10 y 50 mililitros por kilogramo (mL/kg). En otro aspecto, un volumen adecuado para el trasplante es de entre 20 y 40 mL/kg. En otro aspecto, un volumen adecuado para el trasplante es de al menos 10 mL/kg. En otro aspecto, un volumen adecuado para el trasplante es de al menos 20 mL/kg. En un aspecto adicional, un volumen adecuado es de 30 mL/kg.

[0046] La presente divulgación proporciona e incluye un método para recolectar un hemoderivado que contiene células madre en una bolsa de recolección hipóxica. En aspectos como se proporcionan en la presente, la bolsa de recolección hipóxica contiene un anticoagulante para impedir la coagulación de la sangre o el agrupamiento de las células madre. En un aspecto, el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en citrato-fosfato dextrosa (CPD), citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1), dextrosa de citrato ácido (ACD) o heparina. En otro aspecto, el anticoagulante es citrato-fosfato dextrosa (CPD). En otro aspecto el anticoagulante es citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1). En otro aspecto, el anticoagulante es dextrosa de citrato ácido (ACD). En aun otro aspecto, el anticoagulante es heparina.

[0047] En aspectos, el hemoderivado que contiene células madre recolectadas en una bolsa de recolección hipóxica se mezcla para aumentar la disminución de oxígeno del hemoderivado. En aspectos proporcionados en la presente, es importante reducir la presión parcial de oxígeno del hemoderivado que contiene células madre recolectadas en una bolsa de recolección hipóxica tan rápido como sea posible. En un aspecto, el

hemoderivado se mezcla en el entorno absorbedor de oxígeno hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95% después de 1 a 3 horas de mezcla. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla en el entorno absorbedor de oxígeno hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 70 y 95%, entre 60 y 95%, entre 50 y 95%, entre 40 y 95%, entre 30 y 95%, entre 30 y 70%, entre 30 y 80% dentro de 3 horas. En aun otro aspecto, el hemoderivado se mezcla en el entorno absorbedor de oxígeno hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca al menos, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95% dentro de las 3 horas de la mezcla. En aun otro aspecto, el hemoderivado se mezcla durante menos de 3 horas en el entorno absorbedor de oxígeno hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca al menos, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95%.

[0048] En otro aspecto, el hemoderivado que contiene células madre se mezcla hasta que la pO_2 sea menor de 3500 pascales (Pa; equivalente a 26 mmHg), menor de 3000 Pa, menor de 2500 Pa, menor de 2000 Pa, menor de 1500 Pa o menor de 1000 Pa. En aspectos, la pO_2 del hemoderivado que contiene células madre se reduce dentro de las 3 horas de la recolección. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla hasta que la pO_2 es de entre 990 y 3500 Pa, entre 990 y 3000 Pa, entre 990 y 2500 Pa, entre 990 y 2000 Pa, entre 990 y 1500 Pa, o entre 1000 y 3000 Pa. En un aspecto de la presente divulgación, el hemoderivado se mezcla a una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla a una pO_2 de entre 900 y 3500 Pa o 2000 y 3500 Pa.

[0049] En un aspecto de la presente divulgación, el hemoderivado se mezcla durante hasta 3 horas a una presión parcial de oxígeno (pO_2) de entre 900 y 3500 Pa. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla durante no más de 1 hora y hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla durante no más de 2 hora y hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%. En otro aspecto, el hemoderivado se mezcla durante hasta 3 horas y hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%. En aun otro aspecto, el hemoderivado se mezcla durante entre 1 y 3 horas hasta que la presión parcial de oxígeno (pO_2) inicial del hemoderivado se reduzca entre 70 y 95%.

- [0050]** La presente divulgación proporciona diversos métodos para separar las células madre de un hemoderivado en condiciones hipóxicas. En un aspecto de la presente divulgación, las células madre se separan de un hemoderivado (es decir, sangre periférica, sangre de cordón umbilical humano o médula ósea) mediante cromatografía de afinidad con un filtro de retención de células madre. En otro aspecto, las células madre o las células madre y los leucocitos se separan de un hemoderivado mediante filtración con un filtro de reducción de leucocitos y filtro de retención de células madre. En la técnica se conocen diversos filtros de reducción de leucocitos, que incluyen el filtro de reducción de leucocitos Haemonetics® (filtro de eliminación de leucocitos BPF4, Haemonetics®, Braintree, MA). En aun otro aspecto, el filtro de reducción de leucocitos y el filtro de retención de células madre se combinan en un único filtro. En otro aspecto, el filtro de retención de células madre comprende un anticuerpo monoclonal específico de células madre. En otro aspecto, el filtro de retención de células madre comprende un anticuerpo para CD34. En otro aspecto, el filtro de retención de células madre comprende uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD90, CD3e, CD34, CD49f (integrina $\alpha 6$) cKit/CD117, Ly6A/E (Sca-1), CD13, CD29, CD36, CD44, CD73, CD105 y CD146. En otro aspecto, el filtro de retención de células madre comprende dos o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD90, CD3e, CD34, CD49f (integrina $\alpha 6$) cKit/CD117, Ly6A/E (Sca-1), CD13, CD29, CD36, CD44, CD73, CD105 y CD146. En un aspecto adicional, el filtro de retención de células madre comprende tres o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD90, CD3e, CD34, CD49f (integrina $\alpha 6$) cKit/CD117, Ly6A/E (Sca-1), CD13, CD29, CD36, CD44, CD73, CD105 y CD146. En un aspecto adicional, el filtro de retención de células madre comprende cuatro o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD90, CD3e, CD34, CD49f (integrina $\alpha 6$) cKit/CD117, Ly6A/E (Sca-1), CD13, CD29, CD36, CD44, CD73, CD105 y CD146. Las células madre se concentran en el filtro mediante unión y se eluyen del filtro con un medio isotónico. En aspectos, el medio isotónico es un medio reducido en oxígeno que tiene una pO_2 no mayor de 3500 Pa.
- [0051]** En otro aspecto, las células madre se separan de un hemoderivado mediante centrifugación de aspirado de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, lipoaspirado o una mezcla de estos. El sobrenadante se retira y las células madre se vuelven a suspender en una solución de mantenimiento de células madre. Un ejemplo de una solución de mantenimiento de células madre es solución salina amortiguada con fosfato con 3% peso/vol de dextrano. Otro ejemplo de una solución

de mantenimiento de células madre es fosfato amortiguado con 5% de albúmina humana. En un aspecto, las células madre se separan de un hemoderivado hipóxico. En otro aspecto, las células madre se separan de un hemoderivado normóxico. En otro aspecto, un hemoderivado se mezcla con un gradiente de densidad antes de la

5 centrifugación.

[0052] En un aspecto de la presente divulgación, el hemoderivado se separa mediante filtración o centrifugación en condiciones de oxígeno reducido donde la pO_2 se mantiene entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y

10 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa. En otro aspecto, el hemoderivado se separa a una pO_2 de entre 900 y 3500 Pa o 2000 y 3500 Pa.

[0053] En un aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro incluye glóbulos rojos que se trataron para que tengan una saturación de oxígeno menor de

15 20%. En algunos aspectos, los hemoderivados que contienen glóbulos rojos y que tienen células madre pueden obtenerse de sangre periférica (por ejemplo, sangre entera) o sangre de cordón umbilical y médula ósea. En otro aspecto, los hemoderivados que contienen glóbulos rojos y que tienen células madre (por ejemplo, sangre entera) se tratan para que tengan una saturación de oxígeno menor de 20%

20 antes de la extracción de células madre. En otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno menor de 15% después del tratamiento de desoxigenación. En otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno menor de 10% después del tratamiento de

25 desoxigenación. En otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno menor de 5% después del tratamiento de desoxigenación. En aun otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno de entre 4 y 25% después del tratamiento de desoxigenación.

30 En otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno de entre 4 y 20% después del tratamiento de desoxigenación. En otro aspecto, el hemoderivado que se hace pasar a través del filtro comprende glóbulos rojos que tienen una saturación de oxígeno de entre 10 y 20% después del tratamiento de desoxigenación. Se proporcionan métodos

35 para reducir eficazmente el oxígeno de la sangre periférica en las publicaciones

internacionales estadounidenses N.º WO 2016/145210, publicada el 15 de septiembre de 2016, y WO 2016/029069, publicada el 27 de octubre de 2016.

[0054] En un aspecto de la presente divulgación, el filtro de leucocitos, el filtro de recuperación de células madre, o el filtro de leucocitos de recuperación y células madre, así como las soluciones, se mantienen en condiciones hipóxicas que comprenden una presión parcial de oxígeno menor de 3000 Pa pO₂. En algunos aspectos, las células, dispositivos y soluciones se mantienen a una presión parcial de oxígeno menor de 2500 Pa pO₂, menor de 2000 Pa pO₂, menor de 1400 Pa pO₂ o menor de 900 Pa pO₂. En otro aspecto, el filtro de leucocitos, filtro de recuperación de células madre o filtro de leucocitos de recuperación y células madre se mantiene en condiciones hipóxicas que comprenden entre 900 y 3000 Pa pO₂, 900 y 2500 Pa pO₂, 900 y 2000 Pa pO₂, 1400 y 2500 Pa pO₂, o entre 1300 y 2500 Pa pO₂. En otro aspecto, el filtro de leucocitos, filtro de recuperación de células madre o filtro de leucocitos de recuperación y células madre se mantiene en condiciones hipóxicas que comprenden una presión parcial de oxígeno menor de 3000 Pa pO₂ y una presión parcial de dióxido de carbono menor de 6000 Pa. En aun otro aspecto, el filtro de leucocitos, filtro de recuperación de células madre o filtro de leucocitos de recuperación y células madre se mantiene en condiciones hipóxicas que comprenden una presión parcial de oxígeno como se proporciona en este párrafo y una presión parcial de dióxido de carbono menor de 6000 Pa.

[0055] La presente divulgación proporciona e incluye métodos para eluir las células madre concentradas en un filtro de recuperación de células madre. En un aspecto, las células madre concentradas se eluyen en condiciones hipóxicas en un medio isotónico. En ciertos aspectos, el medio isotónico es un medio isotónico. En otros aspectos, el medio isotónico es compatible con el cultivo tisular de células madre. En algunos aspectos, el medio isotónico puede combinarse con componentes adicionales para preparar un medio isotónico. En otro aspecto, la presente divulgación permite eluir células madre concentradas con un medio isotónico. En otro aspecto, la elución comprende tratar las células madre concentradas con 50-200 mL de un medio isotónico. En otro aspecto, la elución comprende tratar las células madre concentradas con al menos 50 mL de un medio isotónico. En otro aspecto, la elución comprende tratar las células madre concentradas con al menos 100 mL de un medio isotónico. En otro aspecto, la elución comprende tratar las células madre concentradas con al menos 150 mL de un medio isotónico. En otro aspecto, la elución comprende tratar las células madre concentradas con 100 mL de un medio isotónico.

[0056] La presente divulgación proporciona e incluye medios isotónicos caracterizados por la presión parcial de oxígeno. En algunos aspectos, el medio isotónico es normóxico (por ejemplo, equilibrado con oxígeno a presión ambiente). En otros aspectos, el medio isotónico tiene una menor presión parcial de oxígeno. En algunos aspectos, el medio isotónico y los componentes tienen una presión parcial de oxígeno menor de 3500 Pa. En otro aspecto, el medio isotónico es un medio isotónico desoxigenado que comprende una pO_2 menor de 3000 Pa, menor de 2500 Pa, menor de 2000 Pa, menor de 1500 Pa o menor de 1000 Pa. En otro aspecto, el medio isotónico es un medio isotónico desoxigenado que comprende una pO_2 de entre 990 y 6000 Pa, entre 990 y 3500 Pa, entre 990 y 3000 Pa, entre 990 y 2500 Pa, entre 990 y 2000 Pa, entre 990 y 1500 Pa o entre 1000 y 3000 Pa. En un aspecto de la presente divulgación, el medio isotónico es un medio isotónico desoxigenado que comprende una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa. En otro aspecto, el medio isotónico es un medio isotónico desoxigenado que comprende una pO_2 de entre 900 y 3000 Pa o 2000 y 3000 Pa. En otro aspecto, las células madre concentradas se eluyen en un recipiente. En aun otro aspecto, las células madre concentradas se eluyen directamente en un recipiente de almacenamiento hipóxico.

[0057] En un aspecto de la presente divulgación, las células madre se eluyen a una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa. En otro aspecto, las células madre se eluyen a una pO_2 de entre 900 y 4000 Pa o 2000 y 4000 Pa.

[0058] En un aspecto de la presente divulgación, las células madre se separan de un hemoderivado y se almacenan en condiciones hipóxicas. En un aspecto, las células madre separadas se transfieren a un recipiente de almacenamiento hipóxico a una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa. En otro aspecto, las células madre se transfieren a un recipiente de almacenamiento hipóxico a una pO_2 de entre 900 y 3500 Pa o 2000 y 3500 Pa.

[0059] En un aspecto, la suspensión de células madre (células madre con una

solución de mantenimiento de células madre) se almacena en una bolsa de almacenamiento hipóxico a temperatura ambiente por hasta 3 días. En otro aspecto, la suspensión de células madre se diluye con un crioprotector y se almacena a -80°C , o en nitrógeno líquido (aproximadamente -195°C). En un aspecto, los crioprotectores para congelar una suspensión de células madre se seleccionan del grupo que consiste en trehalosa, manitol, sacarosa, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dextrano, almidón de hidroxietilo, glucosa, glicerol, polivinil pirrolidona, propilenglicol, polietilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol, formamida, glicerol-3fosfato, prolina, sorbitol, dietilglicol, trietilenglicol y combinaciones de estos. En otro aspecto, las suspensiones de células madre se congelan en una solución que comprende trehalosa y dextrano.

[0060] La presente divulgación proporciona e incluye la recolección de un hemoderivado, separación las células madre y expansión adicional de células madre al cultivarlas en condiciones hipóxicas durante 3-4 días y expandir las células madre entre 3 y 14 veces. Por ejemplo, la presente divulgación permite recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno, mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial de oxígeno ($p\text{O}_2$) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%, separar los leucocitos y las células madre del hemoderivado, expandir las células madre, y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico.

[0061] En un aspecto de la presente divulgación, las células madre separadas se transfieren a un recipiente de expansión de células madre hipóxicas antes de transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico. En otro aspecto, las células madre separadas se transfieren a un recipiente de almacenamiento hipóxico antes de transferir las células madre a un recipiente de expansión de células madre hipóxicas. En otro aspecto, las células madre separadas se transfieren a un recipiente de expansión hipóxica y luego se trasplantan a un paciente que lo necesite.

[0062] En un aspecto de la presente divulgación, las células madre se expanden al colocar las células madre aisladas en un recipiente de expansión de células madre hipóxicas. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se coloca en una agitadora (lineal u orbital) y se conecta a una bolsa hipóxica que comprende un medio de cultivo de alimentación y una bolsa hipóxica para residuos de perfusión como se proporciona en la Figura 2. En otro aspecto, la agitadora se configura a entre 70 y 80 rpm durante un período de tiempo para aumentar la mezcla y la disminución de oxígeno y dióxido de carbono. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas está unido a los adsorbentes de oxígeno y

dióxido de carbono en un sistema cerrado. En otros aspectos, el oxígeno y dióxido de carbono se controlan y mantienen durante la expansión en una atmósfera controlada al reemplazar el oxígeno por un gas inerte, tal como nitrógeno.

[0063] En un aspecto de la presente divulgación, las células madre se expanden al colocar las células madre aisladas (es decir, las células madre eluidas de un filtro de recuperación de células madre) en un recipiente de expansión de células madre hipóxicas con un medio de expansión de células madre, colocar el recipiente de expansión de células madre hipóxicas en una agitadora (linear u orbital) y mezclar las células madre para aumentar la disminución de oxígeno y dióxido de carbono. Por lo general, la mezcla se produce a una velocidad de entre 70 y 80 rpm durante un período de tiempo, pero la persona del oficio de nivel medio sabe seleccionar métodos y velocidades de mezcla adecuados. En un aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 3,000 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 2,500 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 2,000 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,600 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,400 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,200 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicho período de cultivo de expansión de 1 a 5 días.

[0064] En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 3,000 Pa durante un período de cultivo de entre 1 y 5 días y se cultiva para expandir las células entre 3 y 14 veces. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 2,000 Pa durante un período de cultivo de entre 1

y 5 días y se cultiva para expandir las células entre 3 y 14 veces. En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,600 Pa durante un período de cultivo de entre 1 y 5 días y se cultiva para expandir las células entre 3 y 14 veces. En aun otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,400 Pa durante un período de cultivo de entre 1 y 5 días y se cultiva para expandir las células entre 3 y 14 veces. En un aspecto adicional, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,200 Pa durante un período de cultivo de entre 1 y 5 días y se cultiva para expandir las células entre 3 y 14 veces.

[0065] En un aspecto adicional, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo para expandir las células madre de 3 a 14 veces. En un aspecto, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo para expandir las células madre de 3 a 16 veces y preparar una población que comprende al menos 10^4 células. En otro aspecto, se cultiva una población de células madre expandidas para aumentar la cantidad de células CD34+ después de 1 a 5 días al menos 2 veces. En un aspecto, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo para expandir la cantidad de células CD34+ al menos 3 veces después de 1 a 5 días. En otro aspecto, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo para expandir las células madre a una población que comprende entre 5 y 10% de células CD34+. En otro aspecto, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo para expandir las células madre a una población que comprende menos de 2, 1, 0,5, 0,05% y 0,005% de células CD44+. En otro aspecto, las células madre se expanden de 3 a 14 veces y contienen más de 10% de células CD34+ y menos de 2% de células CD44+. En otro aspecto, las células madre se cultivan en condiciones de expansión hipóxica durante un período de tiempo suficiente para expandir las células madre a una población que comprende menos de 1% de células CD90+. En un aspecto, las células madre expandidas comprenden una población de al menos 5% de células CD34+, menos de 2% de células CD44+, y menos de 1% de células CD90+. En un aspecto, las células madre cultivadas en condiciones de expansión hipóxica durante un período de 1 a 5 días mantienen una viabilidad mayor de 98% según lo medido mediante técnicas de tinción celular (es decir, azul de tripano y 7-amino-actinomicina D (7-AAD)).

[0066] La presente divulgación proporciona un recipiente de expansión de células madre hipóxicas que comprende un área de superficie total de entre 0,155 y 0,7 metros cuadrados (m^2). En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de entre 0,155 y 0,31 m^2 . En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,155 m^2 . En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,2 m^2 . En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,3 m^2 . En aun otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,4 m^2 . En otro aspecto, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,5 m^2 . En un aspecto adicional, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de al menos 0,6 m^2 . En un aspecto adicional, el recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total menor de 0,7 m^2 .

[0067] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un recipiente de expansión de células madre hipóxicas que comprende microesferas portadoras. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un recipiente de expansión de células madre hipóxicas que comprende microesferas portadoras y un medio de expansión hipóxica.

[0068] En general, los medios adecuados para la expansión de células madre con los métodos hipóxicos de la presente divulgación se conocen en la técnica. Por lo general, los medios de cultivo celular son medios amortiguados que tienen un pH de entre 6,6 y 7,8, incluyen una fuente de energía (por lo general, glucosa/dextrosa) y proteínas de suero (por ejemplo, albúmina). En algunos aspectos de la presente divulgación, el medio de expansión de células madre se complementa con aditivos o factores de crecimiento para mejorar la expansión de células madre. Los ejemplos de medios de expansión de células madre comunes son StemSpan™ (Stem Cell Technologies, Cambridge, MA) y Stemline (Sigma-Aldrich). En un aspecto, el medio de expansión de células madre comprende uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), activina A, activina B, TGF-beta, VEGF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de células madre (SCF). En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, o seis o más factores de crecimiento seleccionados del

grupo que consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), activina A, activina B, TGF-beta, VEGF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de células madre (SCF). En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende activina A. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende activina B. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende TGF-beta. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende VEGF. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende el factor de células madre (SCF). En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más factores de crecimiento y un pH de entre 6,6 y 7,8. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende un pH de al menos 6,6. En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende un pH de al menos 7. En un aspecto adicional, el medio de expansión de células madre comprende un pH de 7,5.

20 **[0069]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un medio de expansión de células madre que comprende además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en ácido retinoico, ácido ascórbico, hormonas, agentes de elevación de cAMP intracelular, ligando de Flt-3, combinaciones de diferentes citocinas y factores de crecimiento, tales como SCF, Flt3, TPO, IL-3 e IL-6. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende además dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en ácido retinoico, ácido ascórbico, hormonas, agentes de elevación de cAMP intracelular, ligando de Flt-3, combinaciones de diferentes citocinas y factores de crecimiento. En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende ácido retinoico. En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende ácido ascórbico. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende hormonas. En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende agentes de elevación de cAMP intracelular. En otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende un ligando de Flt-3. En aun otro aspecto, el medio de expansión de células madre comprende uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que

consiste en SCF, Flt3, TPO, IL-3 e IL-6. En un aspecto de la presente divulgación, un medio de expansión de células madre comprende uno o más factores de crecimiento, uno o más aditivos y un pH de entre 6,6 y 7,8.

[0070] La presente divulgación permite e incluye recolectar un hemoderivado que
5 contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno. En un aspecto, un
entorno absorbedor de oxígeno es un recipiente de recolección hipóxica que
comprende una capa aislante de oxígeno. En otro aspecto, un entorno absorbedor de
oxígeno es un recipiente de recolección hipóxica que comprende una capa aislante de
10 oxígeno que encierra una capa permeable al oxígeno. En otro aspecto, un entorno
absorbedor de oxígeno es un recipiente de recolección hipóxica que comprende una
capa permeable al oxígeno en contacto con la capa de hemoderivado en un lado y un
absorbente de oxígeno en el otro lado, y una capa aislante de oxígeno que encierra
tanto el absorbente de oxígeno como la capa permeable al oxígeno. En aun otro
15 aspecto, un entorno absorbedor de oxígeno es un recipiente de recolección hipóxica
que comprende una capa permeable al oxígeno, uno o más absorbentes de oxígeno o
de oxígeno y dióxido de carbono, y una capa aislante de oxígeno.

[0071] La presente divulgación también proporciona e incluye un recipiente de
almacenamiento hipóxico para almacenar células madre o glóbulos rojos. En un
aspecto, un recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una capa aislante de
20 oxígeno. En otro aspecto, un recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una
capa aislante de oxígeno que encierra una capa permeable al oxígeno. En otro
aspecto, un recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una capa permeable al
oxígeno en contacto con la capa de hemoderivado en un lado y un absorbente de
oxígeno en el otro lado, y una capa aislante de oxígeno que encierra tanto el
25 absorbente de oxígeno como la capa permeable al oxígeno. En aun otro aspecto, un
recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una capa permeable al oxígeno,
uno o más absorbentes de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono, y una capa
aislante de oxígeno.

[0072] La presente divulgación también proporciona e incluye una capa aislante de
30 oxígeno que es sustancialmente impermeable al oxígeno o al oxígeno y el dióxido de
carbono. En un aspecto, una bolsa aislante de oxígeno está hecha de materiales de
película flexible. En otro aspecto, la capa aislante de oxígeno está hecha de un
material de película rígida o inflexible. Como se proporciona en la presente, la
expresión aislante de oxígeno se refiere a materiales y composiciones que
35 proporcionan una barrera al paso del oxígeno de un lado de la barrera al otro,

suficiente para evitar aumentos significativos en la presión parcial del dióxido de carbono durante 42 días o más.

[0073] A menos que se indique lo contrario, aislante de oxígeno se refiere a membranas que son sustancialmente impermeables al oxígeno. Como se usa en la presente, sustancialmente impermeable al oxígeno es una permeabilidad al oxígeno de menos de alrededor de 1,0 cc de oxígeno por metro cuadrado por día. En otro aspecto, sustancialmente impermeable al oxígeno es una permeabilidad al oxígeno de menos de alrededor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día. En cierto aspecto, una membrana adecuada para su uso en la preparación de una capa aislante de oxígeno es un material caracterizado por un valor Barrer menor de alrededor de 0,140 Barrer. Como se usa en la presente, una capa aislante de oxígeno también es sustancialmente impermeable al dióxido de carbono. Capa aislante de oxígeno sustancialmente impermeable al dióxido de carbono significa que la capa no permite más de 10 cc de dióxido de carbono dentro del receptáculo durante un período de 3 meses y, con mayor preferencia, no más de 5 cc de dióxido de carbono durante un período de 6 meses.

[0074] Los materiales y métodos para preparar una bolsa con barrera impermeable al gas son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense 7,041,800 emitida a Gawryl *et al.*, la patente estadounidense 6,007,529 emitida a Gustafsson *et al.* y la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 3013/0327677 de McDorman, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. También se conocen en la técnica materiales y métodos para preparar un entorno absorbedor de oxígeno y recipientes de recolección y almacenamiento hipóxicos. Ver la patente estadounidense N.º 9,801,784, concedida a Yoshida *et al.*, la patente estadounidense N.º 10,849,824, concedida a Yoshida *et al.*, y la patente estadounidense N.º 10,058,091, concedida a Wolf *et al.*, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los materiales impermeables se usan de manera rutinaria en la técnica y se puede usar cualquier material adecuado. En el caso de los polímeros moldeados, los aditivos se agregan de manera rutinaria para mejorar las propiedades de barrera contra el oxígeno y el dióxido de carbono. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense 4,837,047, concedida a Sato *et al.* Por ejemplo, la patente estadounidense 7,431,995, concedida a Smith *et al.*, describe un receptáculo impermeable al oxígeno y al dióxido de carbono compuesto por capas de copolímero de etileno-alcohol vinílico y copolímero de etileno-acetato de vinilo modificado, impermeable al ingreso de oxígeno y dióxido de carbono.

En otro aspecto, la bolsa con barrera impermeable al gas es impermeable al oxígeno y al dióxido de carbono.

[0075] En ciertos aspectos, las películas que son sustancialmente impermeables al dióxido de carbono, al oxígeno o al dióxido de carbono y al oxígeno son películas laminadas. En un aspecto, una película laminada que es sustancialmente impermeable al dióxido de carbono, al oxígeno o al dióxido de carbono y al oxígeno es una película de lámina laminada. Los materiales de película pueden ser polímeros o construcciones multicapa que son combinaciones de láminas y polímeros. En un aspecto, una película laminada es una membrana de poliéster laminada con aluminio. En la técnica se conoce un ejemplo de película laminada de aluminio adecuada, también conocida como lámina laminada, que es sustancialmente impermeable al oxígeno. Por ejemplo, la patente estadounidense 4,798,728, concedida a Sugisawa, divulga láminas laminadas de aluminio de nylon, polietileno, poliéster, polipropileno y cloruro de vinilideno. Otras películas laminadas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la patente estadounidense 7,713,614 de Chow *et al.* divulga recipientes multicapa que comprenden una resina de copolímero de etileno-alcohol vinílico (EVOH) que es sustancialmente impermeable al oxígeno. En un aspecto, una bolsa con barrera impermeable al gas es una bolsa con barrera construida al sellar tres o cuatro lados por medio de termosellado. La bolsa está construida con una construcción multicapa que incluye materiales que mejoran las propiedades de barrera contra el dióxido de carbono y el oxígeno. La bolsa está construida con una construcción multicapa que incluye materiales que mejoran las propiedades de barrera contra el dióxido de carbono y el oxígeno. Tales materiales incluyen la película Rollprint Clearfoil® V2, que tiene una velocidad de transmisión de oxígeno de 0,01 cc/100 in²/24 h, la película Rollprint Clearfoil® X, que tiene una velocidad de transmisión de oxígeno de 0,004 cc/100 in²/24 h y la película Clearfoil® Z que tiene una velocidad de transmisión de oxígeno de 0,0008 cc/100 in²/24 h (Rollprint Packaging Products, Addison, IL). Otros fabricantes fabrican productos similares con velocidades de transmisión de oxígeno similares, tales como las películas Renolit Solmed Wrapflex® (American Renolit Corp., City of Commerce, CA). Un ejemplo de película laminada de aluminio adecuada, también conocida como lámina laminada, que es sustancialmente impermeable al oxígeno, se puede obtener a través de Protective Packaging Corp. (Carrollton, TX).

[0076] En un aspecto de la presente divulgación, el recipiente de recolección hipóxica comprende una presión parcial de oxígeno (pO₂) menor de 1350 Pa. En otro aspecto,

el recipiente de recolección hipóxica comprende una presión parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) menor de 400 Pa. En otro aspecto, el recipiente de recolección hipóxica comprende una presión parcial $p\text{O}_2$ de entre 990 y 3000 Pa, entre 990 y 2500 Pa, entre 990 y 2000 Pa, entre 990 y 1500 Pa o entre 1000 y 3000 Pa. En otro aspecto de la presente divulgación, el recipiente de recolección hipóxica comprende una $p\text{O}_2$ de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa.

10 **[0077]** En otro aspecto, el recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una presión parcial de oxígeno ($p\text{O}_2$) menor de 1350 Pa. En otro aspecto, el recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una presión parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) menor de 400 Pa. En otro aspecto, el recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una presión parcial $p\text{O}_2$ de entre 990 y 3000 Pa, entre 990 y 2500 Pa, entre 990 y 2000 Pa, entre 990 y 1500 Pa o entre 1000 y 3000 Pa. En otro aspecto de la presente divulgación, el recipiente de almacenamiento hipóxico comprende una $p\text{O}_2$ de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa.

20 **[0078]** La presente divulgación proporciona e incluye métodos para la recolección hipóxica de un hemoderivado y el aislamiento de células madre. En algunos aspectos, el hemoderivado se recolecta en un recipiente de recolección hipóxica y se filtra para aislar y concentrar las células madre. Las células madre se aíslan con un filtro de células madre o de células madre y leucocitos. Las células madre se eluyen del filtro en una bolsa de almacenamiento hipóxico o un recipiente de expansión de células madre hipóxicas con el uso de un medio isotónico como se muestra en la Figura 1. En un aspecto, el medio isotónico comprende de 10 a 30 mM de solución salina amortiguada con fosfato con cloruro de calcio 0,5 mM, sulfato de magnesio 1 mM que contiene ya sea trehalosa 250-500 mM, 3% de dextrano 40 o 3% de dextrano 70 y tiene una tonicidad de 280-300 mOsmol/kg de agua. En un aspecto, el medio isotónico es un medio disponible en el comercio, Plasma-Lyte (Baxter, Deerfield, IL), HypoThermosol (BioLife Solutions Inc., Bothell, WA). En otro aspecto, el medio isotónico comprende además uno o más antioxidantes seleccionados del grupo que
35 consiste en N-acetil cisteína 1 mM, vitamina E soluble en agua Trolox 1 mM, vitamina

C 1 mM, o combinaciones de estas. En otro aspecto, el medio de cultivo de células madre isotónico comprende además dos o más antioxidantes seleccionados del grupo que consiste en N-acetil cisteína 1 mM, vitamina E soluble en agua Trolox 1 mM, vitamina C 1 mM, o combinaciones de estas.

- 5 **[0079]** En otro aspecto, la presente divulgación permite equilibrar el medio isotónico con oxígeno antes de la elución de células madre.

[0080] La presente divulgación proporciona e incluye kits para procesar las células madre para su almacenamiento o trasplante que comprenden un recipiente de recolección hipóxica, un filtro de leucocitos y recuperación de células madre, un primer
10 recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio para recolectar un hemoderivado filtrado con disminución de células madre, y un segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio que comprende un medio de mantenimiento de células madre. En un aspecto de la presente divulgación, el segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio está en comunicación fluida con dicho filtro de leucocitos y
15 recuperación de células madre. En otro aspecto, el kit comprende una presión parcial de oxígeno (pO_2) menor de 1,400 Pa. En otro aspecto, el filtro de leucocitos y células madre es un solo filtro combinado. En otro aspecto, el primer recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente plegable interno permeable al
20 gas, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre el receptáculo externo y el recipiente plegable interno, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través del receptáculo externo y que está en comunicación fluida con el recipiente plegable. En otro aspecto, el kit comprende una pO_2 menor de 1,400 Pa. En otro aspecto, el segundo recipiente de
25 almacenamiento hipóxico accesorio comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente plegable interno permeable al gas, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre el receptáculo externo y el recipiente plegable interno, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través del receptáculo externo y que
30 está en comunicación fluida con el recipiente plegable. En otro aspecto, los recipientes de recolección y almacenamiento hipóxicos incluyen los conocidos y descritos en las publicaciones internacionales N.º WO 2016/172645 y WO 2016/145210 concedidas a Hemanext Inc, ambas incorporadas en la presente por referencia.

[0081] La presente divulgación proporciona e incluye métodos para preparar las
35 células madre para su trasplante que comprenden exponer una bolsa de

almacenamiento hipóxico que comprende células madre congeladas hasta una temperatura de al menos 25°C para formar células madre descongeladas; centrifugar las células madre descongeladas y retirar el sobrenadante; y volver a suspender las células madre en una solución que comprende 3% de dextrano 40. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante en un sujeto que lo necesite que comprende: descongelar las células madre hipóxicas preparadas; expandir las células madre en un sistema de expansión de células madre hipóxicas como se describió anteriormente; y trasplantar las células madre expandidas al sujeto que lo necesite. En otro aspecto, al menos 10⁴ HSC totales se trasplantan a un sujeto que lo necesite. En aun otro aspecto, al menos 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ o 10⁹ HSC totales se trasplantan a un sujeto que lo necesite.

[0082] En otro aspecto, el sistema de expansión de células madre comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente plegable interno, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre el receptáculo externo y el recipiente de sangre plegable interno, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través del receptáculo externo y que está en comunicación fluida con el recipiente plegable. En otro aspecto, el sistema de expansión de células madre comprende un cultivo tridimensional de células madre en un entorno controlado que comprende una pO₂ menor de 1400 Pa. En aun otro aspecto, el sistema comprende un cultivo bidimensional de células madre en un entorno controlado que comprende una pO₂ menor de 1400 Pa.

[0083] La presente divulgación proporciona e incluye métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden recolectar sangre de cordón umbilical humano (HUCB), separar los leucocitos y las células madre con un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre, eluir las células madre del filtro de retención de células madre con un medio isotónico, y transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico.

[0084] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden exponer un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas congeladas hasta 37°C; sumergir la bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas congeladas en un baño de agua a menos de 42°C para descongelar dichas células madre congeladas con el fin de generar células madre descongeladas; diluir las células madre descongeladas con un volumen igual de solución hipóxica que

contiene 2,5% (peso/vol) de albúmina humana para formar células madre diluidas. En otro aspecto, la presente divulgación permite diluir las células madre descongeladas con un volumen igual de solución hipóxica que contiene de 1 a 5% (peso/vol) de albúmina humana para formar células madre diluidas. En otro aspecto, la solución hipóxica contiene al menos 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 y 5% (peso/vol) de albúmina humana. En otro aspecto, la solución hipóxica contiene entre 1 y 2%, entre 1 y 3%, entre 1 y 4%, entre 1 y 5%, entre 2 y 3%, entre 2 y 5%, entre 2 y 4%. En aun otro aspecto, la solución hipóxica contiene menos de 5%, menos de 4,5%, menos de 4%, menos de 3,5%, menos de 3,0%, menos de 2,5%, menos de 2,0% y menos de 1,5%. En aun otro aspecto, la solución hipóxica contiene menos de 5%, menos de 4,5%, menos de 4%, menos de 3,5%, menos de 3,0%, menos de 2,5%, menos de 2,0% y menos de 1,5%.

[0085] En otro aspecto, la solución hipóxica comprende además 5% de dextrano 40. En otro aspecto, las células madre se exponen a 37°C durante 15-30 min. En otro aspecto, la bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende células madre congeladas se coloca en un baño de agua de al menos 32°C. En aun otro aspecto, los métodos para preparar células madre comprenden además centrifugar las células madre diluidas y retirar el sobrenadante. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para preparar las células madre para su trasplante que comprenden además volver a suspender dichas células madre descongeladas en una solución de albúmina y dextrano en un volumen adecuado para su trasplante.

[0086] En un aspecto de la presente divulgación, el recipiente de recolección hipóxica, el filtro de leucocitos, el filtro de recuperación de células madre y el recipiente de almacenamiento hipóxico son parte de un sistema que comprende una pO_2 menor de 1400 Pa (10 mmHg). Más específicamente, los filtros, los dispositivos, las soluciones y otros componentes son parte de un sistema que se mantiene en un estado hipóxico. En otro aspecto, el recipiente de recolección hipóxica, el filtro de leucocitos, el filtro de recuperación de células madre y el recipiente de almacenamiento hipóxico son parte de un sistema que comprende una pO_2 menor de 1350 Pa (10 mmHg). En otro aspecto, el recipiente de recolección hipóxica, el filtro de leucocitos, el filtro de recuperación de células madre y el recipiente de almacenamiento hipóxico están en un sistema que comprende una pO_2 de entre 990 y 3000 Pa, entre 990 y 2500 Pa, entre 990 y 2000 Pa, entre 990 y 1500 Pa o entre 1000 y 3000 Pa. En otro aspecto de la presente divulgación, el recipiente de recolección hipóxica, el filtro de leucocitos, el filtro de recuperación de células madre y el recipiente de almacenamiento hipóxico

están en un sistema que comprende una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa, entre 500 y 2000 Pa, entre 600 y 2000 Pa, entre 700 y 2000 Pa, entre 800 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 900 y 2000 Pa, entre 1000 y 2000 Pa, entre 1200 y 2000 Pa, entre 1400 y 2000 Pa, entre 1600 y 2000 Pa, entre 1800 y 2000 Pa.

- 5 **[0087]** En un aspecto, la presente divulgación proporciona una bolsa de recolección hipóxica que está conectada a dos bolsas de almacenamiento hipóxico accesorias en un sistema hipóxico cerrado. En un aspecto, la presente divulgación proporciona bolsas interconectadas que se centrifugan en un sistema cerrado. En otro aspecto, las bolsas interconectadas se centrifugan y el sobrenadante se expresa en una de las
- 10 bolsas unidas.

- [0088]** La presente divulgación proporciona métodos para preparar células madre para su trasplante que comprenden recolectar un hemoderivado que comprende células madre; separar leucocitos y células madre del hemoderivado; transferir las células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O_2
- 15 caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O_2) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día, y almacenar las células madre en un entorno hipóxico de menos de 3000 Pa de O_2 durante un período de tiempo a una temperatura. En un aspecto de la presente divulgación, el período de almacenamiento es de al menos 2, 4, 7, 10, 14, 21 o 28 días. En otro aspecto, los leucocitos y células madre se separan
- 20 del hemoderivado con un filtro de leucocitos, filtro de recuperación de células madre o filtro combinado de leucocitos y recuperación de células madre, como se describen en la presente divulgación. En otro aspecto, las células madre se eluyen del filtro de recuperación de células madre o filtro de leucocitos y recuperación de células madre con un medio isotónico antes de su almacenamiento en un entorno hipóxico. En otro
- 25 aspecto, el entorno hipóxico es un recipiente de almacenamiento hipóxico proporcionado en la presente divulgación. En otro aspecto, el hemoderivado se recolecta en un recipiente de recolección hipóxica que comprende un aislante de O_2 caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O_2) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno. En otro aspecto, el recipiente de
- 30 recolección hipóxica comprende un aislante de O_2 caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O_2) menor de 25 Barrer. El hemoderivado en el recipiente de recolección hipóxica se mezcla hasta que la presión parcial inicial de oxígeno (pO_2) del hemoderivado se reduce entre 20 y 60%. En otro aspecto, la pO_2 se reduce entre 80 y 95%. En otro aspecto, la pO_2 se reduce entre 50 y 95%. En otro aspecto, la pO_2 se reduce entre 70 y 95%. En otro aspecto, la pO_2 se reduce entre 50 y 95%. En un
- 35

aspecto adicional, las células madre se separan del hemoderivado antes de mezclar.

[0089] La presente divulgación también proporciona métodos que no exponen las células madre a condiciones normóxicas por más de una hora entre las etapas de recolectarlas y transferirlas a un recipiente de almacenamiento hipóxico o un recipiente de expansión de células madre hipóxicas. En un aspecto, las condiciones normóxicas comprenden una presión parcial de oxígeno de al menos alrededor de 157 mmHg (o 21,000 Pa).

[0090] Todas las referencias proporcionadas a lo largo de la presente divulgación se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[0091] La presente divulgación también proporciona las siguientes formas de realización:

[0092] Forma de realización 1. Un método para preparar las células madre para su trasplante a un paciente que lo necesite que comprende: recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno que comprende un recipiente de recolección hipóxica que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O₂) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno; mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial inicial de oxígeno (pO₂) del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%, separar los leucocitos y las células madre de dicho hemoderivado, lo que comprende pasar dicho hemoderivado por un filtro en donde las células madre y los leucocitos se retienen en dicho filtro para preparar un hemoderivado con disminución de leucocitos y células madre; eluir dichas células madre de dicho filtro con un medio isotónico; y

[0093] transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O₂) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y almacenar dichas células para preparar células madre hipóxicas almacenadas.

[0094] Forma de realización 2. El método de acuerdo con la forma de realización 1, que comprende además transferir dichas células madre a un recipiente de expansión de células madre hipóxicas antes o después de dicha transferencia a dicho recipiente de almacenamiento hipóxico y expandir dichas células madre para formar una población de células madre expandidas.

[0095] Forma de realización 3. El método de acuerdo con la forma de realización 2, que comprende además trasplantar dichas células madre expandidas a un paciente que lo necesite.

- [0096]** Forma de realización 4. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde cada una de dicha mezcla, separación, elución y transferencia se realiza a una pO_2 de entre 400 y 2000 Pa.
- 5 **[0097]** Forma de realización 5. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicha mezcla es por hasta 3 horas.
- [0098]** Forma de realización 6. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicha mezcla es hasta que la presión parcial inicial de oxígeno (pO_2) de dicho hemoderivado se reduzca al menos 50%.
- 10 **[0099]** Forma de realización 7. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho medio isotónico es medio isotónico desoxigenado que comprende una pO_2 de al menos 5333 Pa.
- [00100]** Forma de realización 8. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicha transferencia comprende eluir directamente en dicho recipiente de almacenamiento hipóxico.
- 15 **[00101]** Forma de realización 9. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicha elución comprende de 50 a 200 mL de dicho medio isotónico.
- [00102]** Forma de realización 10. El método de acuerdo con la forma de realización 1, que comprende además equilibrar dicho medio isotónico con oxígeno en el aire.
- 20 **[00103]** Forma de realización 11. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho recipiente de almacenamiento hipóxico comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente de sangre interno plegable, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre dicho receptáculo externo y dicho recipiente de sangre interno plegable, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través de dicho receptáculo externo y que está en comunicación fluida hipóxica con dicho recipiente plegable, en donde dicho recipiente de almacenamiento hipóxico comprende menos de 1,400 Pa pO_2 .
- 25 **[00104]** Forma de realización 12. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho hemoderivado se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre de cordón umbilical humano (HUCB) y médula ósea.
- [00105]** Forma de realización 13. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dichas células madre son células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de células sanguíneas.
- 35

[00106] Forma de realización 14. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica contiene un anticoagulante.

5 **[00107]** Forma de realización 15. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho filtro comprende un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre.

[00108] Forma de realización 16. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde los glóbulos rojos contenidos en dicho hemoderivado comprenden una saturación de oxígeno de glóbulos rojos menor de una saturación de
10 20%, 15%, 10%, 5%, 1% o 0,01% de $O_2(sO_2)$ durante dicha separación en dicho filtro.

[00109] Forma de realización 17. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica, dicho filtro y dicho recipiente de almacenamiento hipóxico están en un sistema que comprende una pO_2 menor de 1350 Pa.

15 **[00110]** Forma de realización 18. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho filtro se mantiene en condiciones hipóxicas que comprenden una presión parcial de oxígeno (pO_2) menor de 6000 Pa.

[00111] Forma de realización 19. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica o dicho recipiente de
20 almacenamiento hipóxico comprende una presión parcial de oxígeno (pO_2) menor de 1350 Pa.

[00112] Forma de realización 20. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica, dicho recipiente de almacenamiento hipóxico o tanto dicho recipiente hipóxico como dicho recipiente de
25 almacenamiento hipóxico comprenden una presión parcial de dióxido de carbono (pCO_2) menor de 6000 Pa.

[00113] Forma de realización 21. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dicho filtro de reducción de leucocitos y dicho filtro de retención de células madre son un filtro combinado de leucocitos y células madre.

30 **[00114]** Forma de realización 22. El método de acuerdo con la forma de realización 14, en donde dicho anticoagulante es citrato-fosfato dextrosa (CPD), citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1), dextrosa de citrato ácido (ACD) o heparina.

[00115] Forma de realización 23. El método de acuerdo con la forma de
35 realización 1, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica está en comunicación

fluida con dicho filtro y dicho filtro está en comunicación fluida con dicho recipiente de almacenamiento hipóxico, en donde la combinación comprende menos de 1,400 Pa pO₂.

5 **[00116]** Forma de realización 24. El método de acuerdo con la forma de realización 15, en donde dicho filtro comprende un anticuerpo monoclonal específico de células madre.

[00117] Forma de realización 25. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dichas células madre hipóxicas almacenadas se mantienen a una presión parcial de oxígeno menor de 1400 pascales.

10 **[00118]** Forma de realización 26. El método de acuerdo con la forma de realización 1, que comprende además determinar la cantidad total de células nucleadas en dicho hemoderivado, en dichas células madre eluidas, en dichas células madre hipóxicas almacenadas, o combinaciones de estos.

[00119] Forma de realización 27. El método de acuerdo con la forma de realización 26, en donde dicha determinación de las cantidades de células es después de dicha recolección.

[00120] Forma de realización 28. El método de acuerdo con la forma de realización 26 o 27, en donde dicha determinación de las cantidades de células es después de dicha filtración.

20 **[00121]** Forma de realización 29. El método de acuerdo con la forma de realización 28, en donde la cantidad total de células nucleadas en dichas células madre eluidas comprende al menos 50% de la cantidad total de células nucleadas en dicho hemoderivado.

[00122] Forma de realización 30. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dichas células madre son células madre hematopoyéticas (HSC).

[00123] Forma de realización 31. El método de acuerdo con la forma de realización 30, en donde dichas células madre hematopoyéticas comprenden uno o más marcadores de células madre hematopoyéticas seleccionados del grupo que
30 consiste en la proteína de dedo anular 4 de grupo Polycomb (BMI-1), cúmulo de diferenciación 21 (CD21), cúmulo de diferenciación 22 (CD22), cúmulo de diferenciación 34 (CD34), cúmulo de diferenciación 38 (CD38), cúmulo de diferenciación 41 (CD41), cúmulo de diferenciación 44 (CD44), cúmulo de diferenciación 45 (CD45), cúmulo de diferenciación 48 (CD48), cúmulo de
35 diferenciación 90 (CD90; Thy 1), cúmulo de diferenciación 105 (CD105), cúmulo de

diferenciación 106 (CD106), cúmulo de diferenciación 117 (CD117; kit c), cúmulo de diferenciación 127 (CD127), cúmulo de diferenciación 150 (CD150), c-myc, receptor de la proteína endotelial c (EPCR), antígeno de linfocito 6 (Ly6A/E; sca-1), MYB, proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide inducida (Mcl-1), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), Skp, culina, caja F (SCF; ligando de kit), transductor y activador único de la transcripción 5a (STAT5a), transductor y activador único de la transcripción 5b (STAT5b) y receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2).

[00124] Forma de realización 32. El método de acuerdo con la forma de realización 30, que comprende además trasplantar al menos 10^4 células madre hipóxicas almacenadas a dicho paciente que lo necesite.

[00125] Forma de realización 33. El método de acuerdo con la forma de realización 2, en donde dicho recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de entre 0,155 y 0,7 metros cuadrados (m^2).

[00126] Forma de realización 34. El método de acuerdo con la forma de realización 33, en donde dicho recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende un área de superficie total de 0,155 a 0,31 m^2 .

[00127] Forma de realización 35. El método de acuerdo con la forma de realización 33, en donde dicho recipiente de expansión de células madre hipóxicas comprende microesferas portadoras y un medio de expansión de células madre.

[00128] Forma de realización 36. El método de acuerdo con la forma de realización 35, en donde dicho medio de expansión de células madre comprende factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), activina A, activina B y TGF-beta, VEGF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor de células madre (SCF).

[00129] Forma de realización 37. El método de acuerdo con la forma de realización 35, en donde dicho medio de expansión de células madre comprende un pH de entre 6,6 y 7,8.

[00130] Forma de realización 38. El método de acuerdo con la forma de realización 35, en donde dicho medio de expansión de células madre comprende aditivos seleccionados del grupo que consiste en ácido retinoico, ácido ascórbico, hormonas o agentes de elevación de cAMP intracelular, ligando de Flt-3, combinaciones de diferentes citocinas y factores de crecimiento, tales como SCF, Flt3, TPO, IL-3 e IL-6.

- [00131]** Forma de realización 39. El método de acuerdo con la forma de realización 33, en donde dicho recipiente de expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 3,000 pascales (Pa) a temperatura y presión estándar (STP) durante dicha expansión.
- 5 **[00132]** Forma de realización 40. El método de acuerdo con la forma de realización 39, en donde dicha pO₂ durante dicha expansión de células madre hipóxicas se mantiene a una presión parcial de oxígeno menor de 1,400 pascales a STP.
- 10 **[00133]** Forma de realización 41. El método de acuerdo con la forma de realización 33, en donde dicha expansión de células madre comprende cultivar en condiciones hipóxicas que comprenden una pO₂ menor de 1,400 pascales a STP, durante un período de cultivo de 3 a 4 días, para preparar una población de células madre hipóxicas expandidas.
- 15 **[00134]** Forma de realización 42. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha expansión de dichas células madre hipóxicas comprende cultivar durante un período para aumentar dichas células madre de 3 a 14 veces.
- 20 **[00135]** Forma de realización 43. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha expansión comprende cultivar durante un período suficiente para expandir dichas células madre hipóxicas con el fin de preparar una población que comprende al menos 10⁴ células.
- 25 **[00136]** Forma de realización 44. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha población de células madre expandidas comprende un aumento de al menos 2 veces de células CD34+ después de dicha expansión.
- 30 **[00137]** Forma de realización 45. El método de acuerdo con la forma de realización 44, en donde dicha población de células madre expandidas comprende un aumento de al menos 3 veces de células CD34+ después de dicha expansión.
- [00138]** Forma de realización 46. El método de acuerdo con la forma de realización 45, en donde dicha población de células madre expandidas comprende entre 5 y 10% de células CD34+.
- [00139]** Forma de realización 47. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha población de células madre expandidas comprende menos de 2, 1 o 0,005% de células CD44+.
- 35 **[00140]** Forma de realización 48. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha población de células madre expandidas es de menos

de 1% de células CD90+.

[00141] Forma de realización 49. El método de acuerdo con la forma de realización 33, en donde dichas células madre almacenadas son células madre mesenquimales (MSC) que comprenden uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD44, CD90, CD105, CD106, CD166 y Stro-1.

[00142] Forma de realización 50. El método de acuerdo con la forma de realización 41, en donde dicha población de células madre expandidas comprende una viabilidad mayor de 98%.

[00143] Forma de realización 51. El método de acuerdo con la forma de realización 50, en donde dicha viabilidad se mide con un ensayo de exclusión con azul de tripano.

[00144] Forma de realización 52. El método de acuerdo con la forma de realización 50, en donde dicha viabilidad se mide mediante exclusión celular de 7-amino-actinomicina D (7-AAD).

[00145] Forma de realización 53. El método de acuerdo con la forma de realización 1, en donde dichas células madre hipóxicas almacenadas mantienen una viabilidad mayor que las células madre recolectadas, almacenadas y cultivadas en condiciones normóxicas, en donde dichas condiciones normóxicas comprenden una presión parcial de oxígeno de al menos alrededor de 21,000 pascales.

[00146] Forma de realización 54. Un método para preparar las células madre para su transfusión que comprende:

[00147] recolectar un hemoderivado que comprende células madre; separar los leucocitos y las células madre de dicho hemoderivado; transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende un aislante de O₂ caracterizado por una permeabilidad al oxígeno (O₂) menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día, y almacenar dichas células madre en un entorno hipóxico a una presión parcial de oxígeno menor de 3500 Pa durante un período de tiempo a una temperatura menor de 37°C.

[00148] Forma de realización 55. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde dicho recipiente de almacenamiento hipóxico comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente de sangre interno plegable, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre dicho receptáculo externo y dicho recipiente de sangre interno plegable, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través de dicho receptáculo externo y que está en comunicación fluida con dicho recipiente

plegable, en donde dicha combinación comprende menos de 1,400 Pa pO₂.

[00149] Forma de realización 56. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde recolectar dicho hemoderivado comprende un entorno hipóxico que tiene una presión parcial de oxígeno menor de 3000 Pa.

5 **[00150]** Forma de realización 57. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde dicho hemoderivado se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre de cordón umbilical humano (HUCB) y médula ósea.

[00151] Forma de realización 58. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde dichas células madre son células madre pluripotentes
10 inducidas (iPSC).

[00152] Forma de realización 59. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde dicha separación comprende centrifugación para preparar células madre concentradas.

[00153] Forma de realización 60. El método de acuerdo con la forma de
15 realización 59, que comprende además reducir los leucocitos antes o después de dicha centrifugación.

[00154] Forma de realización 61. El método de acuerdo con la forma de realización 59, que comprende además retirar el sobrenadante de dichas células madre concentradas y volver a suspender dichas células madre concentradas en un
20 medio de suspensión de células madre hipóxicas.

[00155] Forma de realización 62. El método de acuerdo con la forma de realización 61, en donde dicho medio de suspensión de células madre se diluye con un crioprotector seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, manitol, sacarosa, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dextrano, almidón de hidroxietilo, glucosa, glicerol, polivinil
25 pirrolidona, propilenglicol, polietilenglicol, 2-metil-2,4-pentanodiol, formamida, glicerol-3fosfato, prolina, sorbitol, dietilglicol, trietilenglicol y combinaciones de estos.

[00156] Forma de realización 63. El método de acuerdo con la forma de realización 62, en donde dicho almacenamiento es a -80°C o en nitrógeno líquido a aproximadamente -195,79°C.

30 **[00157]** Forma de realización 64. El método de acuerdo con la forma de realización 54, en donde dicha al menos una entrada/salida comprende además un tubo unitario que es sustancialmente impermeable al oxígeno que comprende un primer tubo, una conexión, y un segundo tubo, en donde dicho tubo unitario es un tubo que atraviesa el aislante y que tiene al menos una capa aislante de oxígeno, y al
35 menos una capa compatible con la sangre.

[00158] Forma de realización 65. Un método para preparar las células madre para su trasplante que comprende: recolectar sangre de cordón umbilical humano (HUCB); separar los leucocitos y las células madre de dicha HUCB al pasar la HUCB por un filtro de reducción de leucocitos y un filtro de retención de células madre; eluir dichas células madre de dicho filtro de retención de células madre con un medio isotónico; y transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico.

[00159] Forma de realización 66. El método de acuerdo con la forma de realización 65, en donde dicho medio isotónico comprende solución salina amortiguada con fosfato 10-30 mM con cloruro de calcio 0,5 mM, sulfato de magnesio 1 mM que contiene ya sea trehalosa 250-500 mM, 3% de dextrano 40 o 3% de dextrano 70 y tiene una tonicidad de 280-300 mOsmol/kg de agua.

[00160] Forma de realización 67. El método de acuerdo con la forma de realización 66, en donde dicho medio isotónico comprende además un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en N-acetil cisteína 1 mM, vitamina E soluble en agua Trolox 1 mM, vitamina C 1 mM, o combinaciones de estas.

[00161] Forma de realización 68. El método de acuerdo con la forma de realización 65, en donde dicho filtro de reducción de leucocitos y dicho filtro de retención de células madre son el mismo filtro.

[00162] Forma de realización 69. El método de acuerdo con la forma de realización 65, en donde dicho método se realiza a una presión parcial de oxígeno menor de 3500 Pa.

[00163] Forma de realización 70. Un kit para procesar las células madre para su trasplante que comprende: un recipiente de recolección hipóxica; un filtro de leucocitos y recuperación de células madre; un primer recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio para recolectar el sobrenadante filtrado; un segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio que comprende un medio de mantenimiento de células madre; en donde dicho segundo recipiente de almacenamiento hipóxico accesorio está en comunicación fluida con dicho filtro de leucocitos y recuperación de células madre, en donde dicho kit comprende menos de 1,400 pascales (Pa) de presión parcial de oxígeno (pO₂).

[00164] Forma de realización 71. El kit de acuerdo con la forma de realización 70, en donde dicho filtro de leucocitos y células madre es un solo filtro.

[00165] Forma de realización 72. El kit de acuerdo con la forma de realización 70, en donde dicho primer recipiente de almacenamiento hipóxico

accesorio comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente de sangre interno plegable, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre dicho receptáculo externo y dicho recipiente de sangre interno plegable, y al menos una entrada/salida que es

5 sustancialmente impermeable y que pasa a través de dicho receptáculo externo y que está en comunicación fluida con dicho recipiente plegable, en donde dicha comunicación fluida comprende menos de 1,400 Pa pO₂.

[00166] Forma de realización 73. El kit de acuerdo con la forma de realización 70, en donde dicho segundo recipiente de almacenamiento hipóxico

10 accesorio comprende un receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente de sangre interno plegable, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre dicho receptáculo externo y dicho recipiente de sangre interno plegable, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través de dicho receptáculo externo y que

15 está en comunicación fluida con dicho recipiente plegable.

[00167] Forma de realización 74. El método de acuerdo con la forma de realización 70, en donde dichos recipientes de almacenamiento hipóxico accesorios primero y segundo comprenden además un espaciador seleccionado del grupo que consiste en una malla, una esterilla moldeada, una esterilla tejida, una esterilla no

20 tejida, una espuma de celda abierta, un velo de hebras y una esterilla de hebras.

[00168] Forma de realización 75. Un método para preparar las células madre para su trasplante que comprende: exponer un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas almacenadas congeladas hasta 37°C; sumergir dicha bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende células

25 madre hipóxicas almacenadas congeladas en un baño de agua a menos de 42°C para descongelar dichas células madre congeladas para generar células madre hipóxicas almacenadas descongeladas; diluir dichas células madre hipóxicas almacenadas descongeladas con un volumen igual de solución hipóxica que contiene 2,5% (peso/vol) de albúmina humana para formar células madre hipóxicas almacenadas

30 diluidas.

[00169] Forma de realización 76. El método de acuerdo con la forma de realización 75, en donde dicha solución comprende además 5% de dextrano 40.

[00170] Forma de realización 77. El método de acuerdo con la forma de realización 75, en donde dicho baño de agua está a al menos 32°C.

35 **[00171]** Forma de realización 78. El método de acuerdo con la forma de

realización 75, en donde dicha exposición es durante 15-30 min.

[00172] Forma de realización 79. El método de acuerdo con la forma de realización 75, que comprende además centrifugar dichas células madre diluidas y retirar el sobrenadante.

- 5 **[00173]** Forma de realización 80. El método de acuerdo con la forma de realización 75, que comprende además volver a suspender dichas células madre hipóxicas almacenadas descongeladas en una solución de albúmina y dextrano hasta un volumen adecuado para su trasplante.

- [00174]** Forma de realización 81. El método de acuerdo con la forma de
10 realización 80, en donde dicho volumen adecuado para su trasplante es de entre 10 y 50 mililitros por kilogramo (mL/kg).

- [00175]** Forma de realización 82. Un método para preparar las células madre para su trasplante que comprende: exponer una bolsa de almacenamiento hipóxico que comprende células madre hipóxicas almacenadas congeladas a al menos
15 25°C para formar células madre hipóxicas almacenadas descongeladas;

[00176] centrifugar dichas células madre hipóxicas almacenadas descongeladas y retirar el sobrenadante; y volver a suspender dichas células madre hipóxicas almacenadas en una solución que comprende 3% de dextrano 40, en donde la bolsa de almacenamiento hipóxico comprende un entorno hipóxico de menos de 3500 Pa.

- 20 **[00177]** Forma de realización 83. Un método para preparar las células madre para su trasplante a un sujeto que lo necesite que comprende: descongelar las células madre hipóxicas almacenadas; expandir dichas células madre hipóxicas almacenadas en un sistema de expansión de células madre hipóxicas para preparar células madre hipóxicas expandidas; y

- 25 **[00178]** trasplantar dichas células madre hipóxicas expandidas a dicho sujeto que lo necesite, en donde la bolsa de almacenamiento hipóxico comprende un entorno hipóxico de menos de 3500 Pa.

- [00179]** Forma de realización 84. El método de acuerdo con la forma de realización 83, en donde dicho sistema de expansión de células madre comprende un
30 receptáculo externo sustancialmente impermeable al oxígeno, un recipiente de sangre interno plegable, un absorbente de oxígeno o de oxígeno y dióxido de carbono situado entre dicho receptáculo externo y dicho recipiente de sangre interno plegable, y al menos una entrada/salida que es sustancialmente impermeable y que pasa a través de dicho receptáculo externo y que está en comunicación fluida con dicho recipiente
35 plegable.

[00180] Forma de realización 85. El método de acuerdo con la forma de realización 83, en donde dicho sistema de expansión de células madre comprende una bolsa de biorreactor de un solo uso.

5 **[00181]** Forma de realización 86. El método de acuerdo con la forma de realización 83, en donde dicho sistema de expansión de células madre comprende un cultivo tridimensional de células madre en un entorno controlado que comprende una pO₂ menor de 1400 Pa.

10 **[00182]** Forma de realización 87. El método de acuerdo con la forma de realización 83, en donde dicho sistema comprende un cultivo bidimensional de células madre en un entorno controlado que comprende una pO₂ menor de 1400 Pa.

15 **[00183]** Forma de realización 88. Un método para preparar las células para su trasplante que comprende recolectar un hemoderivado que contiene células madre en un entorno absorbedor de oxígeno que comprende un recipiente de recolección hipóxica, en donde dicho recipiente de recolección hipóxica comprende un aislante de oxígeno (O₂) caracterizado por una permeabilidad al O₂ menor de 0,5 cc de oxígeno por metro cuadrado por día y un absorbente de oxígeno; mezclar el hemoderivado hasta que la presión parcial de oxígeno (pO₂) inicial del hemoderivado se reduzca entre 80 y 95%, separar los leucocitos y las células madre de dicho hemoderivado, que comprende pasar dicho hemoderivado por un filtro de unión de células madre para
20 preparar un hemoderivado con disminución de leucocitos y células madre; eluir dichas células madre de dicho filtro con un medio isotónico; y transferir dichas células madre a un recipiente de almacenamiento hipóxico que comprende una bolsa interna compatible con células que comprende un material que tiene una permeabilidad al oxígeno (O₂) mayor de 25 Barrer y formar células madre hipóxicas almacenadas, en
25 donde dichas células madre no se exponen a condiciones normóxicas por más de una hora entre dicha recolección y dicha transferencia, en donde dichas condiciones normóxicas comprenden una presión parcial de oxígeno de al menos alrededor de 21,000 pascales.

30 **[00184]** Forma de realización 89. El método de acuerdo con la forma de realización 88, en donde dicha separación se realiza antes de dicha mezcla.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Recolección y análisis de sangre de cordón umbilical humano

35 **[00185]** Se recolectan alrededor de 150 mL de HUCB en una bolsa de recolección de sangre estéril que contiene el anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1, 21 mL de anticoagulante cada 150 mL de HUCB) de acuerdo con

los protocolos del New York Blood Center, Nueva York (EE. UU.). Se transfieren alícuotas de cincuenta mililitros (50 mL) a bolsas etiquetadas A, B y C. Las bolsas A, B y C se colocan en un agitador de plaquetas lineal durante 3 horas para reducir el porcentaje de saturación de oxígeno en la hemoglobina de los glóbulos rojos a diferentes niveles. La HUCB de la bolsa A es la sangre de control de almacenamiento aeróbico que tiene una saturación de oxígeno de 80 a 90%. La HUCB de la bolsa B es una muestra de almacenamiento hipóxico que tiene entre 10 y 20% de SO_2 . La HUCB de la bolsa C es una muestra de almacenamiento hipóxico que tiene entre 1 y 5% de SO_2 . Las concentraciones de los componentes celulares (leucocitos, plaquetas y eritrocitos) de HUCB se miden con el analizador de hematología Sysmex (Sysmex America, Chicago, IL), el porcentaje de saturación de oxígeno de la hemoglobina de los glóbulos rojos (% de SO_2). La presión parcial de oxígeno (PO_2 en mmHg) y la presión parcial de dióxido de carbono (PCO_2) se medirán con el analizador de gas ABL 90 (Radiometer, Brea, CA).

[00186] Las bolsas se almacenan a temperatura ambiente durante 76 horas después de la recolección y el procesamiento. Se retiran alícuotas (de 15 mL cada una) de las bolsas A, B y C después de 24, 36 y 72 horas de almacenamiento para analizar la calidad, viabilidad y diferenciación de HSC en la sangre de cordón umbilical.

Ejemplo 2: Análisis de citometría de flujo de células CD34+ en sangre de cordón umbilical humano

[00187] Las concentraciones de células CD34+ en la HUCB prefiltración y las suspensiones celulares recuperadas se miden con un citómetro de flujo (FacsCalibur; Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.) con un sistema de inmunofluorescencia directa de tres colores con tubos Becton Dickinson ProCount (Becton Dickinson). El kit Becton Dickinson Pro-Count Progenitor Cell Enumeration contiene reactivo CD34+ (vial "A"), reactivo de control (vial "B") y tubos TruCount. El reactivo CD34 contiene una mezcla de los siguientes reactivos: un tinte de ácido nucleico que permite la detección de todas las células nucleadas, incluso leucocitos y glóbulos rojos nucleados; el anticuerpo CD34 monoclonal murino etiquetado con ficoeritrina (PE) que reconoce la HSPC humana presente en células precursoras hematopoyéticas inmaduras y todas las células formadoras de colonias hematopoyéticas en la HUCB; IgG1PE, un control de isotipo para evaluar la tinción o eventos no específicos; y el anticuerpo CD45 monoclonal murino etiquetado con peridina-clorofila-proteína (PerCP) que reconoce el antígeno de leucocito humano que está presente en todos los

leucocitos y se expresa débilmente o no se expresa en las células hematopoyéticas. El vial “B” del kit ProCount es el reactivo de control y contiene una mezcla del tinte de ácido nucleico, IgG1 etiquetada con PE, un control de isotipo para evaluar la tinción o eventos no específicos, ya que reconoce solo el antígeno de hemocianina de lapa californiana no expresado en células humanas; y CD45-PerCP.

[00188] Para cada muestra de HUCB, dos tubos TrueCount™ se etiquetan como “A” para CD34+ (“tubos A” en adelante) y “B” para el control (“tubos B” en adelante). Se transfieren veinte (20) µL del reactivo A CD34+ a tubos A, y 20 µL de reactivo B de control a tubos B. Se agregan cincuenta (50) µL de la muestra de HUCB bien mezclada (ya sea antes de la filtración o recuperada del filtro) tanto a tubos A como a tubos B. Los tubos se agitaron en vórtice suavemente para mezclar la muestra. Todas las muestras se incuban a temperatura ambiente (22°C) a oscuras durante 15 min. Las muestras de prueba se combinan con una cantidad predeterminada de microesferas fluorescentes que sirven como estándar interno a partir del cual se extrapola el volumen de muestra contado. Después de 15 min, se agregan 450 µL de solución de lisado FACS™ tanto a tubos A como a tubos B. Los tubos se incuban durante 30 min a oscuras y temperatura ambiente. Las muestras se analizan de acuerdo con el método de lisado/sin lavado del fabricante, mediante el uso del citómetro de flujo FACSCalibur™ (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón operado a 15 mW y una longitud de onda de excitación de 488 nm y el *software* BD ProCount 2.0 para la adquisición y análisis automatizados de datos. El instrumento se calibra diariamente con microesferas etiquetadas (Calibrite™, Becton-Dickinson) mediante el *software* FACSCComp™ (Becton-Dickinson).

[00189] El porcentaje de recuperación de células CD34+ se calcula con la siguiente fórmula:

Porcentaje de recuperación (%) = $\frac{\text{concentración posterior a la filtración de CD34/mL} + \times \text{volumen}}{\text{concentración anterior a la filtración de CD34/mL} + \times \text{volumen}} \times 100$

(concentración anterior a la filtración de CD34/mL + × volumen)

Ejemplo 3: Ensayo clonogénico hematopoyético y viabilidad celular

[00190] La HUCB prefiltración y las células recuperadas después de la filtración de células de HUCB se colocan en un ensayo de células formadoras de colonias (CFC) por triplicado a una concentración celular de 3×10^4 y 1×10^5 células por bandeja. Las células se cultivan en una matriz semisólida MethoCult™. Los cultivos se incuban a 37°C y 5% de CO₂ en condiciones normóxicas (21% de oxígeno) o hipóxicas (5% de

oxígeno) durante 14 días. Las colonias se califican según su morfología. En este ensayo, las poblaciones de células progenitoras proliferan y forman colonias de células maduras reconocibles. Las células que forman colonias se denominan CFC o CFU y se identifican como CFU de eritroides (CFU-E), unidad formadora de erupción de eritroides, CFU de granulocitos y macrófagos, CFU de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos. Los datos se presentan como la cantidad de colonias cada 3×10^5 células contadas para cada líneas de células progenitoras. La viabilidad de las células en HUCB antes de la filtración y en las suspensiones de las células recuperadas después de la filtración se evalúan con exclusión con tinte azul de tripano (StemCell Technologies). Se cuenta un total de 100 células y los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad como la cantidad de células vivas (no teñidas) dividida por la cantidad total de células contadas (células teñidas y no teñidas).

Ejemplo 4: Preparación y almacenamiento hipóxicos de células madre

[00191] Se recolectan alrededor de 60-90 mililitros (mL) de sangre de cordón umbilical humano (HUCB) de un donante y en una bolsa de recolección de sangre estéril que contiene citrato-fosfato-dextrosa-adenina 1 (CPDA-1) de acuerdo con el protocolo estándar del New York Blood Center - National Cord Blood Program (NYBC-NCBP). La HUCB se recibe en las instalaciones del NCBP dentro de las 24 horas de su recolección. Las concentraciones de los componentes celulares (leucocitos, plaquetas y eritrocitos) de HUCB se miden con el analizador de hematología Sysmex (Sysmex America, Chicago, IL). El porcentaje de saturación de oxígeno de la hemoglobina de los glóbulos rojos (% de SO_2), la presión parcial de oxígeno (PO_2 en mmHg) y la presión parcial de dióxido de carbono (PCO_2) se miden con un analizador de gas ABL 90 (Radiometer, Brea, CA).

[00192] Se transfieren alícuotas de alrededor de 20-30 mL de la HUCB a bolsas estériles etiquetadas como A (almacenamiento aeróbico de control a 30-90% de SO_2 tal como se recibió), B (almacenamiento hipóxico, 10-20% de SO_2) y C (almacenamiento hipóxico, 0-10% de SO_2). Los glóbulos rojos presentes en la HUCB de las bolsas B y C se desoxigenan a entre 10 y 20% de SO_2 y entre 0 y 10% de SO_2 , respectivamente. Tras 24 y 48 horas después de la desoxigenación al nivel adecuado de % de SO_2 , se evalúa cada muestra con un ensayo clonogénico hematopoyético (CFU), ensayo de viabilidad: se evalúa la viabilidad de las células CD45+ y CD34+ mediante citometría de flujo y exclusión de 7-AAD).

Ejemplo 5: Preparación y almacenamiento hipóxicos de células madre

[00193] La media y la desviación estándar de los datos se calculan con el

programa estadístico Prism (Intuitive Software for Sciences, GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Se analizarán las diferencias en los parámetros medidos con una prueba t de Student de dos colas tanto para los datos emparejados como para los no emparejados, en donde un nivel de probabilidad menor de 0,05 se considera significativo. Se evalúa un total de 20 HUCB para cada condición de almacenamiento el día 0 (antes e inmediatamente después del procesamiento de 3 horas) y 24, 36 y 76 horas después del procesamiento (N=20).

Ejemplo 6: Recolección hipóxica y concentración de células madre mediante tecnología de filtración

10 **[00194]** Se recolecta sangre de cordón umbilical humano (HUCB) de un paciente y directamente en una bolsa de recolección hipóxica (A) que comprende anticoagulante de citrato-fosfato dextrosa para impedir la coagulación de la sangre o el aglomeramiento de las células madre. La bolsa de recolección hipóxica está unida a un filtro de retención de células madre unido a una bolsa secundaria para recolectar el fluido filtrado. Se disminuye el oxígeno de la HUCB y se la filtra con un filtro de reducción de leucocitos para capturar los leucocitos y las células madre como se indica en la Figura 1. El efluente se recolecta en una bolsa de almacenamiento hipóxico (B). Las células madre concentradas se recuperan al purgar el filtro que contiene células madre con 100 mL de medio de cultivo de células madre isotónico.

15

20 Las células madre se purgan en la posición retrógrada en una bolsa de almacenamiento hipóxico (C) que contiene medio de mantenimiento de células madre, corriente arriba del filtro (Figura 1).

Ejemplo 7: Recolección hipóxica y concentración de células madre mediante centrifugación

25 **[00195]** Se recolecta sangre de cordón umbilical humano (HUCB), sangre periférica, aspirado de médula ósea o lipoaspirado en una bolsa de recolección hipóxica que está conectada a dos bolsas de almacenamiento hipóxico accesorias en un sistema hipóxico. El hemoderivado en la bolsa de recolección hipóxica se centrifuga para concentrar las células madre. El sobrenadante se retira y las células madre se vuelven a suspender en medio de mantenimiento de células madre. Las células madre se almacenan en la bolsa de almacenamiento hipóxico por hasta 3 días, se ajustan a la dosis adecuada para trasplante mientras aún están en la bolsa de almacenamiento anaeróbico, y luego se trasplantan directamente a un paciente. Alternativamente, las células madre se diluyen con un crioprotector y se almacenan en nitrógeno líquido a -

30

35 80°C.

Ejemplo 8: Expansión hipóxica de células progenitoras aisladas

- [00196]** Las células madre se recolectan en primer lugar en una bolsa de almacenamiento hipóxico que contiene el volumen adecuado de anticoagulante. Las células madre se aíslan y se concentran como se describe en el Ejemplo 6 o 7. Las HSC luego se transfieren de la bolsa de almacenamiento anaeróbico a una bolsa de expansión disponible en el comercio (por ejemplo, biorreactor GE Healthcare WAVE, Terumo Quantum Cell Expansion System) para la expansión de las HSC en condiciones de almacenamiento hipóxico. La expansión varía de 3 a 14 veces a lo largo de 3 a 4 días con una viabilidad celular mayor de 98%.
- [00197]** La suspensión de células madre expandidas se concentra mediante centrifugación. El sobrenadante se retira y las células madre se vuelven a suspender en solución de mantenimiento de células madre. La suspensión de células madre se ajusta a la dosis adecuada para trasplante mientras aún está en la bolsa de almacenamiento anaeróbico. Alternativamente, la suspensión de células madre se diluye con el crioprotector adecuado y luego se almacena en nitrógeno líquido (LN) a -80°C.

Ejemplo 9: Expansión hipóxica de células progenitoras aisladas

- [00198]** Las células madre se recolectan, se aíslan y se concentran como se describe en el Ejemplo 6 o 7. Las células madre aisladas se transfieren de la bolsa de almacenamiento hipóxico a una bolsa hipóxica unida integralmente que contiene microesferas portadoras/soporte y un medio de expansión de células madre. Las células madre se expanden durante 3-4 días. La suspensión de células madre luego se concentra mediante centrifugación. El sobrenadante se retira y las células madre se vuelven a suspender en solución de mantenimiento de células madre. La suspensión de células madre se ajusta a la dosis adecuada para trasplante mientras aún está en la bolsa de almacenamiento anaeróbico o se diluye con el crioprotector adecuado y se almacena a -80°C o en nitrógeno líquido.

Ejemplo 10: Descongelación de la suspensión de células madre congelada y preacondicionamiento hipóxico

- [00199]** Las HSC congeladas, preparadas de acuerdo con el Ejemplo 8 o 9, se retiran del congelador y se exponen a la fase gaseosa durante alrededor de 15 minutos. Las HSC luego se exponen a aire ambiente durante 5 minutos para permitir que la bolsa de almacenamiento hipóxico recupere algo de elasticidad. La bolsa de almacenamiento hipóxico se sumerge en un baño de agua a 37°C para una rápida descongelación. Después de descongelar, las células madre se diluyen con un

volumen igual de solución que contiene 2,5% (peso/vol) de albúmina humana y 5% de dextrano 40 en una solución isotónica. El sobrenadante se retira mediante centrifugación y las células madre sedimentadas se vuelven a suspender lentamente en solución de albúmina/dextrano al volumen y la dosis adecuados para su trasplante.