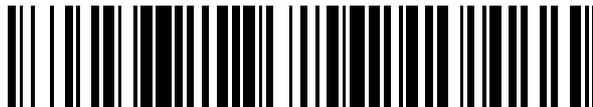


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 203**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99906799 .4**

96 Fecha de presentación: **08.02.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1069821**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.2001**

54 Título: **MÉTODO DE CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS Y MADRE.**

30 Prioridad:  
**17.02.1998 US 24195**  
**07.08.1998 US 130367**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.12.2011**

73 Titular/es:  
**GAMIDA CELL LTD.**  
**5 NAHUM HAFZADI STREET, OFER BUILDING**  
**GIVAT SHAUL**  
**95484 JERUSALEM, IL y**  
**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND**  
**DEVELOPMENT LTD.**

72 Inventor/es:  
**PELED, Tony;**  
**FIBACH, Eitan;**  
**TREVES, Avi y**  
**FRIEDMAN, Mark, M.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 370 203 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de control de la proliferación y diferenciación de células progenitoras y madre.

**Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a

- 5 (1) un método de expansión de células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo*, mientras que al mismo tiempo se inhibe la diferenciación de dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas, comprendiendo el método proporcionar a dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo* condiciones para la proliferación celular y un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en tetraetilenpentamina (TEPA), etilendiamina (EDA), pentaetilenhexamina (PEHA), trietilentetramina (TETA),  
 10 penicilamina y captopril, en el que dichas condiciones para la proliferación celular comprenden nutrientes y al menos una citocina de acción temprana o citocinas de acción temprana, en el que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas son células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas, y en el que dicho quelante y dichas condiciones de proliferación dan como resultado
- (i) proliferación activa prolongada;
- 15 (ii) expansión a largo plazo de células clonogénicas (CFUc); y
- (iii) mantenimiento de células indiferenciadas en su estado indiferenciado;
- con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano;
- 20 (2) un método de transducción de células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas indiferenciadas, expandidas con un exogén, comprendiendo el método:
- (a) expandir e inhibir la diferenciación de dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas:
- (i) proporcionando a dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas condiciones para la proliferación celular, en el que dichas condiciones para la proliferación celular comprenden nutrientes y al menos una citocina de acción temprana o citocinas de acción temprana y en el que dichas células  
 25 progenitoras y madre hematopoyéticas son células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas;
- (ii) poniendo en contacto dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas con un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, en el que dicho quelante y dichas condiciones de proliferación dan como resultado proliferación activa prolongada; expansión a largo plazo de células clonogénicas (CFUc); y mantenimiento de células  
 30 indiferenciadas en su estado indiferenciado; inhibiendo de ese modo la diferenciación y expansión de dichas células hematopoyéticas *ex vivo*; y
- (b) transducir dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas, expandidas terapéuticas con el exogén, con la condición de que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano;
- 35 (3) una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas que comprende células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, teniendo dicha población:
- (i) una mayor proporción de células progenitoras y madre hematopoyéticas en proliferación;
- (ii) una mayor proporción de células clonogénicas (CFUc); y
- 40 (iii) una mayor proporción de células indiferenciadas mantenidas en su estado indiferenciado
- en comparación con una población similar de células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo* cultivadas sin contacto con dicho quelante de metales de transición;
- (4) un método de conservación de células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas que comprende poner en contacto las células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas con un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, en el que dicho contacto se realiza en al menos una de las etapas de recogida, aislamiento y almacenamiento de las células hematopoyéticas indiferenciadas, con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano;
- 45 (5) bolsas de recogida de células madre, complementadas con una cantidad de un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, siendo
- 50

dicha cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de una población de células hematopoyéticas indiferenciadas;

- 5 (6) el uso de una composición de células hematopoyéticas terapéuticas que comprende una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto que necesita el trasplante de células madre hematopoyéticas, en el que dicha población se caracteriza por tener:
- (i) una mayor proporción de células progenitoras y madre hematopoyéticas en proliferación;
  - (ii) una mayor proporción de células clonogénicas (CFUc); y
  - (iii) una mayor proporción de células indiferenciadas mantenidas en su estado indiferenciado
- 10 en comparación con una población similar de células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo* cultivadas sin contacto con dicho quelante de metales de transición;
- 15 (7) una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas que comprende células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, proporcionándose dicha población en un medio que comprende dicho quelante de metales de transición.

### **Proliferación y diferenciación celular**

20 La producción normal de células sanguíneas (hematopoyesis) implica los procesos de proliferación y diferenciación que están estrechamente acoplados. En la mayoría de las células hematopoyéticas, tras la división, las células hijas experimentan una serie de cambios progresivos que finalmente culminan en células sanguíneas funcionales, totalmente diferenciadas (maduras), que en su mayor parte carecen de potencial proliferativo.

25 Por tanto, el proceso de diferenciación limita y finalmente detiene la división celular. Sólo en una pequeña minoría de las células hematopoyéticas, conocidas como células madre, la división celular puede dar como resultado una progenie que es similar o idéntica a sus células antecesoras. Este tipo de división celular, conocida como autorrenovación, es una propiedad inherente de las células madre y ayuda a mantener una pequeña reserva de células madre en su estado más indiferenciado. Algunas células madre pierden su capacidad de autorrenovación y tras la división celular se diferencian en diversos tipos de progenitores de linaje comprometido que finalmente dan lugar a células maduras. Mientras que estas últimas proporcionan la capacidad funcional del sistema de células sanguíneas, las células madre son responsables del mantenimiento de la hematopoyesis durante toda la vida a pesar de la pérdida continua de las células más diferenciadas a través de apoptosis (muerte celular programada) y/o

30 eliminación activa de células maduras envejecidas por el sistema reticuloendotelial.

Tal como se detalla adicionalmente a continuación, la expansión de las células madre y otras subpoblaciones de células linfohemopoyéticas definidas mediante cultivo *ex vivo* podría tener importantes aplicaciones clínicas.

35 Una variedad de protocolos han sugerido y experimentado para el enriquecimiento de tales poblaciones. Las principales estrategias experimentales empleadas incluyen la incubación de células mononucleares con o sin selección de CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (8); con diferentes cócteles de factores de crecimiento tempranos y tardío (17); con o sin suero (7); en cultivos estacionarios, cultivos con intercambio de medio rápido (18) o en perfusión continua (biorreactores) (6); y con o sin una capa de células estromales establecida (19).

40 Aunque se obtuvo a menudo una expansión significativa de progenitores intermedios y tardíos durante cultivos *ex vivo* de 7-14 días, la magnitud de células madre hematopoyéticas tempranas (CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD<sub>38</sub><sup>-</sup>) con alto potencial proliferativo habitualmente disminuía (6, 20-22).

Por tanto, estos cultivos no dan como resultado una verdadera expansión de células madre, sino en su lugar una proliferación y diferenciación de las células madre en células preprogenitoras, acompañado por un agotamiento de la reserva de células madre primitiva.

45 Con el fin de lograr una expansión *ex vivo* máxima de células madre, deben cumplirse las siguientes condiciones: (i) la diferenciación debe inhibirse o retrasarse de manera reversible y (ii) la autorrenovación debe prolongarse de manera máxima.

### **Papel del cobre en la diferenciación celular:**

La posible implicación del cobre en el desarrollo de células hematopoyéticas debe deducirse a partir de los siguientes hallazgos:

50 **Síntomas clínicos de la deficiencia de cobre:** La deficiencia de cobre puede resultar de defectos hereditarios, tales como síndrome de Menkes o enfermedad celiaca, o de estados adquiridos. Estos últimos están asociados normalmente con malnutrición. Puede provocarse por una nutrición parenteral total no complementada con cobre

- (por ejemplo, tras resección intestinal), por el consumo de altos niveles de zinc, que interfiere con la utilización del cobre, en recién nacidos de bajo peso o alimentado con leche de vaca (mala fuente de cobre), lo que puede dar como resultado casos graves en el síndrome de Shwachman. El tratamiento desequilibrado con quelantes de cobre en casos de sobrecarga de cobre tales como en la enfermedad de Wilson puede conducir también a deficiencia de cobre.
- Los síntomas clínicos de la deficiencia de cobre pueden incluir alteración del crecimiento, el desarrollo cerebral, la morfología y resistencia de los huesos, la contractilidad miocárdica, el metabolismo del colesterol y la glucosa, los mecanismos de defensa del huésped (inmunitarios) y más.
- De particular relevancia para este estudio es el hecho de que la deficiencia de cobre está asociada a menudo con anomalías hematológicas, incluyendo anemia, neutropenia y trombocitopenia. Todas estas manifestaciones patológicas no responden a la terapia con hierro, pero se revierten rápidamente tras la complementación con cobre (27-28).
- Se desconoce el mecanismo mediante el cual la deficiencia de cobre conduce a neutropenia. Entre las posibles causas, o bien solas o bien en combinación están: (i) muerte temprana de células progenitoras en la médula ósea (MO); (ii) alteración de la formación de neutrófilos a partir de células progenitoras en la MO; (iii) disminución de la tasa de maduración celular en la MO; (iv) alteración de la liberación de neutrófilos de la MO a la circulación; (v) potenciación de la tasa de eliminación de neutrófilos circulantes.
- El examen de la MO de pacientes neutropénicos deficientes en cobre demuestra la ausencia de células maduras ("detención de la maduración"). Se ha mostrado que las células derivadas de tal MO no formaban colonias en medio semisólido que contenía suero deficiente en cobre, pero conservaban el potencial de crecimiento de colonias normal en suero que contenía cobre. Estos resultados indican la presencia de progenitores intactos en la MO del paciente, y sugiere que el bloqueo en el desarrollo se produce de manera distal a la fase progenitora (29-30).
- El efecto del cobre en las líneas celulares:** Se estudió también el efecto del cobre en líneas celulares establecidas *in vitro* (31-34). Una línea de este tipo (HL-60) se derivó de un paciente con leucemia promielocítica aguda. Estas células, que tienen las características de mieloblastos y promielocitos, pueden crecer indefinidamente en cultivo. Tras la adición de diversos agentes, tales como ácido retinoico (AR), al medio de cultivo, las células experimentan diferenciación, que da como resultado células que demuestran algunas, pero no todas, las características de granulocitos maduros.
- El estudio del estado del cobre en estas células ha mostrado que aunque el contenido en cobre citosólico por célula no era significativamente diferente en células tratadas con AR en comparación con células no tratadas, el contenido en cobre por contenido en proteína era el doble. Esto se debe al hecho de que las células tratadas con AR tienen aproximadamente la mitad del contenido en proteína en comparación con sus homólogas no tratadas. Usando  $^{67}\text{Cu}$ , se ha mostrado que la tasa de captación de cobre era significativamente más rápida durante los dos primeros días de tratamiento con AR, pero no a tiempos posteriores. La distribución intracelular de  $^{67}\text{Cu}$  se encontró predominantemente en fracciones de alto peso molecular (PM) (> 100 kD) y una fracción de PM inferior de aproximadamente 20 kD, con una proporción superior de cobre presente en las fracciones de alto PM en células tratadas con AR.
- La adición de cobre en exceso a medio de crecimiento complementado con suero regular aumentó modestamente la diferenciación inducida por AR. Aunque las células HL-60 tratadas con AR no representan necesariamente el desarrollo celular normal, estos resultados apuntan a la posibilidad de que la diferenciación neutrofilica pueda requerir cobre.
- En otros experimentos se ha mostrado que las células HL-60 pueden hacerse deficientes en cobre mediante tratamiento con quelantes de cobre, y que tras tal tratamiento su viabilidad y tasa de crecimiento no se ven afectadas.
- Aunque todos estos fenómenos se han atribuido al cobre, se ha notificado que algunos efectos clínicos y biológicos se comparten por el cobre y otros metales de transición:
- Por ejemplo, también pudieron observarse síntomas clínicos similares a los observados en la deficiencia de cobre tras el consumo de altos niveles de zinc (40-42), que se sabe que interfiere con la utilización de cobre (por ejemplo, 43).
- En un estudio de carcinoma hepatocelular humano, se encontró que las concentraciones tanto de cobre como de zinc en el tejido tumoral disminuían con el grado de diferenciación histológica (44).
- En otro estudio, se mostró que la adición de cobre, zinc y hierro a cultivos primarios de hepatocitos de rata inducía la replicación celular y la formación de estructuras similares a conductos. Las células que revestían los conductos se volvieron morfológica y bioquímicamente características de células de conducto biliar (45).
- Se sabe que diversos metales de transición incluyen en la producción y actividades de muchas enzimas y factores

5 de transcripción asociados con la diferenciación. Los ejemplos incluyen la superóxido dismutasa que contiene Cu/Zn (46); las metalotieninas y sus factores de regulación de la transcripción (por ejemplo, MTF-1) (47-49); la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70) (50); la proteína p62 que se asocia con la proteína activadora de ras-GTPasa durante la diferenciación de queratinocitos (51); una esfingomielinasa neutra que se activa durante la diferenciación inducida de células HL-60 (52); y la leucina aminopeptidasa de cristalino bovino (53).

10 Al reducir la presente invención a la práctica, se encontró que una serie de agentes químicos que se unen a (quelan) metales de transición, cobre en particular, pueden inhibir (retrasar) el proceso de diferenciación de células madre así como células progenitoras intermedias y tardías y de ese modo estimulan y prolongan la fase de proliferación de células activas *ex vivo*. Este efecto recién descubierto del agotamiento del cobre y otros metales de transición (agotamiento o bien parcial o bien completo) se usó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células hematopoyéticas.

### Sumario de la invención

15 Según la presente invención, se proporciona un método de expansión de una población de células, mientras que al mismo tiempo se inhibe la diferenciación de las células tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las citocinas de acción temprana se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando FLT3, interleucina 6, trombopoyetina e interleucina 3.

20 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además proporcionar una citocina de acción tardía o citocinas de acción tardía.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las citocinas de acción tardía se seleccionan del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

25 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células se derivan de una fuente seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical neonatal.

Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, las células están enriquecidas en células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hematopoyéticas.

30 Las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células madre indiferenciadas y células progenitoras comprometidas.

Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, se proporciona un método de transducción de células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas indiferenciadas, expandidas con un exógeno tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

35 Según características todavía adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la transducción se efectúa mediante un vector que incluye el exógeno.

40 Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descrita a continuación, se proporciona una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones. Según otra realización de la presente invención, se proporciona un método de conservación de células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

Respectivamente, además según la presente invención se proporcionan bolsas de recogida de células madre tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

45 La presente invención aborda satisfactoriamente los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando un método de propagación de células, retrasando aún su diferenciación mediante la deficiencia en metales de transición.

Se describen ventajas y características adicionales del método según la presente invención a continuación en el presente documento.

### Breve descripción de los dibujos

50 La invención descrita en el presente documento, a modo de ejemplo sólo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra el efecto a corto plazo de TEPA sobre el potencial clonogénico de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron

- 5 en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivo líquido, a  $3 \times 10^4$  células/ml, en presencia de citocinas a baja dosis: ligando FLT3 - 5 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, con o sin diferentes concentraciones de TEPA. En el día 7, se sometieron a ensayo alícuotas de 0,1 ml para determinar las células que formaban colonias clonando las células en medio semisólido y puntuando las colonias tras 14 días. Se presentan los resultados de dos experimentos independientes.
- 10 La figura 2 muestra el efecto a corto plazo de TEPA sobre células CD<sub>34</sub> y totales. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivo líquido en presencia de ligando FLT3 - 5 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, con o sin TEPA (20  $\mu$ M). En el día 7, se semidespoblaron los pocillos mediante la eliminación de la mitad del volumen del cultivo y sustituyéndolo por medio nuevo e IL-3 (20 ng/ml). En el día 14, se determinaron el porcentaje de células CD<sub>34</sub> (derecha) y el número de células total (izquierda) multiplicado por el factor de dilución.
- 15 La figura 3 muestra el efecto a largo plazo de TEPA sobre el número de células y el potencial clonogénico de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivo líquido, a  $3 \times 10^4$  células/ml, en presencia de citocinas a dosis alta: ligando FLT3 - 50 ng/ml, SCF - 50 ng/ml, IL-6 - 50 ng/ml, IL-3 - 20 ng/ml, G-CSF - 10 ng/ml, EPO - 1 U/ml, con o sin TEPA (20  $\mu$ M). En el día 4, se diluyeron los cultivos 1:10 con 0,9 ml medio nuevo complementado con citocinas y TEPA. En el día 7, 14 y 21, se semidespoblaron los cultivos mediante la eliminación de la mitad del volumen del cultivo y sustituyéndolo por medio nuevo, citocinas y TEPA, tal como se indica. Se contaron las células del medio recogido y se clonaron alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Se representan los números de células (arriba) en el cultivo líquido y de colonias (abajo) en el cultivo semisólido, multiplicados por los factores de dilución. \* indica agrupaciones de células y colonias pequeñas.
- 20 La figura 4 muestra el efecto a largo plazo de TEPA sobre células CD<sub>34</sub> cultivadas con citocinas tempranas. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivo líquido en presencia de: ligando FLT3 - 50 ng/ml, SCF - 50 ng/ml y trombopoyetina (TPO) - 20 ng/ml, con o sin TEPA (10  $\mu$ M). A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos mediante la eliminación de la mitad del volumen del cultivo y sustituyéndolo por medio nuevo, citocinas y TEPA, tal como se indica. Se contaron las células del medio recogido y se clonaron alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Se representan los números de células (abajo) en el cultivo líquido y de colonias (arriba) en el cultivo semisólido, multiplicados por los factores de dilución. \* indica que no se desarrollaron colonias.
- 25 La figura 5 muestra el efecto de TEPA sobre el desarrollo de precursores eritroides. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica, obtenidas de un donante normal adulto, en el sistema de cultivo líquido de dos fases eritroide (23-25). Se complementó la segunda fase del cultivo o bien sin o bien con 10  $\mu$ M de TEPA. Se analizaron los cultivos para determinar las células totales y las células que contenían hemoglobina [positivas para bencidina (B<sup>+</sup>)] tras 14 días.
- 30 Las figuras 6a-d muestran el efecto de TEPA sobre la maduración celular. Se muestra la morfología de células en cultivos a largo plazo (7 semanas) en ausencia (6a y 6c) y presencia (6b y 6d) de TEPA. Se tiñeron portaobjetos preparados con Cytospin con May-Grunwald Giemsa. Aumentos: 6a y 6b x 600; 6c y 6d x 1485.
- 35 La figura 7 muestra el efecto de quelantes de metales de transición sobre el número de células y el potencial clonogénico de cultivos iniciados con células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivos líquidos en presencia de ligando FLT3 (- 20 ng/ml, SCF - 20 ng/ml, IL-3 - 20 ng/ml, IL-6 - 20 ng/ml, y o bien TEPA - 10  $\mu$ M, captopril (CAP) - 10  $\mu$ M o bien penicilamina (PEN) - 10  $\mu$ M, tal como se indica. En el día 7, se contaron las células y se sembraron en placa alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Las barras presentan el número de células total ( $\times 10^3$ /ml) en el día 7 y el número de colonias por placa 14 días tras la clonación.
- 40 La figura 8 muestra el efecto del cobre sobre el potencial clonogénico y el número de células total de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivos líquidos en presencia de citocinas: ligando FLT3 - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml. Se complementaron los cultivos con sulfato de cobre - 5  $\mu$ M y TEPA - 20  $\mu$ M, tal como se indica. En el día 7, se contaron las células (abajo) y se sembraron en placa alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Se puntuaron las colonias tras 14 días (arriba).
- 45 La figura 9 muestra el efecto de iones sobre el potencial clonogénico de células CD<sub>34</sub> cultivadas. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivos líquidos en presencia de ligando FLT3 - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, y o bien con o bien sin TEPA - 10  $\mu$ M. Se complementaron los cultivos con sulfato de cobre - 5 mM, selenito de sodio - 5 mM o transferrina saturada con hierro 0,3 mg/ml, tal como se indica. En el día 7, se sembraron en placa alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Se puntuaron las colonias tras 14 días.
- 50 La figura 10 muestra el efecto del zinc sobre el potencial proliferativo de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón en cultivos líquidos en presencia de ligando FLT3 - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, y o bien TEPA - 10  $\mu$ M o bien sulfato de zinc - 5 mM o ambos. En el día 7, se sembraron en placa alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células iniciadoras en medio semisólido. Se puntuaron las
- 55

colonias tras 14 días.

- 5 Las figuras 11a-c muestran el efecto de TEPA sobre cultivos de CD<sub>34</sub> a largo plazo. Se iniciaron los cultivos con 10<sup>4</sup> células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón sembrando en placa células purificadas en medio líquido en presencia de SCF, ligando FLT3 e IL-6 (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml) con o sin TEPA (10 μM). A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos mediante la eliminación de la mitad de las células seguido por la adición de medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas, se contaron las células y se sometieron a ensayo para determinar las células que formaban colonias (CFUc) mediante clonación en medio semisólido. Se calculó la frecuencia de CFUc como el número de CFUc por número de células. La clonación de células CD<sub>34</sub> purificadas en el día 1 produjo 2,5x10<sup>3</sup> CFUc por 10<sup>4</sup> células iniciadoras. \* indica que no se desarrollaron colonias.
- 10 Las figuras 12-14 muestran el efecto de TEPA sobre la proliferación celular, CFUc y frecuencia de CFUc en presencia de diferentes combinaciones de citocinas tempranas. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en la figuras 11a-c en medio líquido en presencia de SCF, ligando FLT3 e IL-6 (SCF, FLT, IL-6), cada uno a 50 ng/ml, con o sin TEPA (10 μM). Además, se complementaron los cultivos o bien con IL-3 (20 ng/ml), TPO (50 ng/ml) o bien con ambos, tal como se indica. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas, se contaron las células (figura 12), se sometieron a ensayo para determinar la CFUc (figura 13) y se calculó la frecuencia de CFUc (figura 4). \* indica que no se desarrollaron colonias.
- 15 La figura 15 muestra el efecto de G-CSF y GM-CSF sobre la frecuencia de CFUc de cultivos de CD<sub>34</sub> control y complementados con TEPA. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. Tras una semana, se complementó la mitad de los cultivos control y con TEPA con las citocinas de acción tardía G-CSF y GM-CSF (10 ng/ml cada una). A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas 3, 4 y 5, se contaron las células, se sometieron a ensayo para determinar la CFUc y se calculó la frecuencia de CFUc.
- 20 Las figuras 16-17 muestran el efecto del cambio de medio + TEPA parcial o completo sobre la proliferación celular a largo plazo y la producción de CFUc. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. A intervalos semanales, se eliminó la mitad del contenido del cultivo (células y sobrenadante) y se sustituyó por medio nuevo, citocinas con o sin TEPA (cambio parcial). Alternativamente, se recogió todo el contenido del cultivo, se centrifugó, se desecharon el sobrenadante y la mitad de las células y volvieron a cultivarse las células restantes en medio nuevo, citocinas con o sin TEPA (cambio completo). En las semanas indicadas se determinaron el número de células (figura 16) y la CFUc (figura 17).
- 25 La figura 18 muestra el efecto de TEPA sobre la expansión de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. En las semanas 1, 2 y 3, se enumeraron las células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> mediante citometría de flujo. \* indica que no se desarrollaron colonias.
- 30 La figura 19 muestra el efecto de la adición retrasada de TEPA sobre la frecuencia de CFUc. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. Se añadió TEPA (10 μM) al inicio de los cultivos (día 1) o 6 días más tarde. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas 3, 4 y 5, se contaron las células, se sometieron a ensayo para determinar la CFUc y se calculó la frecuencia de CFUc.
- 35 La figura 20 muestra el efecto de la preincubación a corto plazo con una única citocina sobre la producción de CFUc a largo plazo. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en la figuras 11a-c. Se complementaron los cultivos en el día 1 con o sin TEPA (10 μM) y con SCF, ligando FLT3 IL-6, (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml). Alternativamente, se complementaron los cultivos en el día 1 con TEPA (10 μM) y ligando FLT3 (50 ng/ml) como única citocina. Se añadieron SCF, IL-6 (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml) a estos cultivos en el día 2. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas, se sometieron a ensayo las células para determinar la CFUc.
- 40 Las figuras 21a-b muestran el efecto de agentes quelantes de poliamina sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. Se añadieron los agentes quelantes de poliamina tetraetilenpentamina (TEPA), pentaetilenhexamina (PEHA), etilendiamina (EDA) o trietiltetramina (TETA), a diferentes concentraciones. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y quelantes. En las semanas 3, 4, 6 y 7, se contaron las células y se sometieron a ensayo para determinar la CFUc. Los resultados presentados son para concentraciones con actividad óptima: TEPA - 40 μM, PEHA - 40 μM, EDA - 20 μM y TETA - 20 μM.
- 45 Las figuras 22a-b muestran el efecto de agentes quelantes de metales de transición sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. Se añadieron los quelantes captopril (CAP), penicilamina (PEN) y TEPA, a diferentes concentraciones. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y quelantes. En las semanas 4, 5 y 7, se contaron las células y se sometieron a ensayo para determinar la CFUc. Los resultados presentados son para
- 55

concentraciones con actividad óptima: TEPA - 10  $\mu$ M, PEN - 5  $\mu$ M y CAP - 40  $\mu$ M.

Las figuras 23a-b muestran el efecto del zinc sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón tal como se detalla en las figuras 11a-c. Se añadió zinc (Zn), a diferentes concentraciones, en el día 1. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo, citocinas y Zn. En las semanas 4, 5 y 7, se contaron las células y se sometieron a ensayo para determinar la CFUC.

La figura 24 muestra el efecto de TEPA sobre cultivos de células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre periférica. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre periférica tal como se detalla en las figuras 11a-c. Se complementaron los cultivos con o sin TEPA. A intervalos semanales, se semidespoblaron los cultivos y se complementaron con medio nuevo y TEPA. En las semanas 1 y 4, y, se sometieron a ensayo las células para determinar la CFUC. \* indica que no se desarrollaron colonias.

### Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de un método de control de la proliferación y diferenciación de células progenitoras y madre hematopoyéticas tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones que puede usarse para proporcionar una preparación de células cultivadas *ex vivo* terapéuticas que incluye una gran población de células, en las que se inhibió la diferenciación mientras que se propaga la expansión. Específicamente, la presente invención puede usarse para proporcionar células madre hematopoyéticas, así como células progenitoras, para trasplantes de células hematopoyéticas, células madre adecuadas para manipulaciones genéricas, que pueden usarse para terapia génica, y nuevos medios de tratamiento para enfermedades, tales como, pero sin limitarse a,  $\beta$ -hemoglobinopatía.

La presente invención se refiere a un método de control de la proliferación y diferenciación de células progenitoras y madre hematopoyéticas tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método de imposición de proliferación pero restricción de diferenciación de células progenitoras y madre hematopoyéticas modificando la disponibilidad de metales de transición, cobre en particular, tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

Los principios y el funcionamiento de un método según la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones y ejemplos adjuntos.

En el transcurso del presente estudio, se encontró que una serie de agentes químicos que se unen a (quelan) cobre y otros metales de transición, o que interfieren con el metabolismo del cobre pueden inhibir (retrasar) de manera reversible el proceso de diferenciación de células madre así como células progenitoras intermedias y tardías y de ese modo estimular y prolongar la fase de proliferación de células activas.

Este efecto recién descubierto del agotamiento de metales de transición se utilizó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células hemopoyéticas. Tales células expandidas *ex vivo* pueden aplicarse en varias situaciones clínicas. A continuación se enumeran algunas.

Trasplante de células hemopoyéticas: El trasplante de células hemopoyéticas se ha convertido en el tratamiento de elección para una variedad de enfermedades malignas o heredadas. Mientras que los primeros procedimientos de trasplante utilizaban toda la población de la médula ósea (MO), recientemente se han usado poblaciones más definidas, enriquecidas en células madre (células CD<sub>34</sub><sup>+</sup>) (1).

Además de la médula, tales células podrían derivarse de otras fuentes tales como sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical neonatal (CU) (2). En comparación con MO, el trasplante con células de SP acorta el periodo de pancitopenia y reduce el riesgo de infección y hemorragia (3-5).

Una ventaja adicional de usar SP para el trasplante es su accesibilidad. El factor limitante para el trasplante de SP es el bajo número de células progenitoras/ madre pluripotentes circulantes.

Para obtener suficientes células madre derivadas de SP para trasplante, estas células se "recogen" mediante leucoféresis repetida tras su movilización desde la médula a la circulación mediante tratamiento con quimioterapia y citocinas (3-4). Obviamente, tal tratamiento no es adecuado para donantes normales.

El uso de células madre expandidas *ex vivo* para trasplante tiene las siguientes ventajas (2, 6-7).

Reduce el volumen de sangre requerido para la reconstitución de un sistema hemopoyético adulto y puede obviar la necesidad de movilización y leucoféresis (3).

Permite el almacenamiento de un pequeño número de células madre de SP o CU para un posible uso futuro.

En el caso de trasplante autólogo de pacientes con tumores malignos, células tumorales contaminantes en infusión autóloga a menudo contribuyen a la recidiva de la enfermedad (3). La selección y expansión de células madre CD<sub>34</sub><sup>+</sup> reducirá la carga de células tumorales en el trasplante final.

Los cultivos proporcionan un agotamiento significativo de linfocitos T, lo que puede ser útil en la situación de

trasplante alogénico para reducir la enfermedad de injerto contra huésped.

5 Estudios clínicos han indicado que el trasplante de células expandidas *ex vivo* derivadas de un pequeño número de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> de SP puede restaurar la hemopoyesis en pacientes tratados con altas dosis de quimioterapia, aunque los resultados no permiten aún una conclusión firme sobre las capacidades hemopoyéticas *in vivo* a largo plazo de estas células cultivadas (3-4).

10 Para el éxito del trasplante, el acortamiento de la duración de la fase citopénica, así como el injerto a largo plazo, es crucial. La inclusión de células progenitoras intermedias y tardías en el trasplante podría acelerar la producción de células madre derivadas del donante y acortar la fase citopénica. Es importante, por tanto, que las células expandidas *ex vivo* incluyan, además de células madre, progenitores más diferenciados con el fin de optimizar la recuperación a corto plazo y la restauración a largo plazo de la hemopoyesis. La expansión de células progenitoras intermedias y tardías, especialmente las comprometidas a los linajes neutrófilo y megacariocítico, de manera concomitante a la expansión de células madre, podría servir para este fin (8).

15 Tales cultivos podrían ser útiles no sólo en la restauración de la hematopoyesis en pacientes con médula ósea completamente suprimida sino también como medida de apoyo para acortar la recuperación de la médula ósea tras radio o quimioterapias convencionales.

20 Diagnóstico prenatal de defectos genéticos en células escasas: El diagnóstico prenatal implicaba la recogida de células embrionarias de una mujer embarazada y el análisis de las mismas para detectar defectos genéticos. Un modo preferido, no invasivo, de recogida de células embrionarias implica la separación de precursores de glóbulos rojos nucleados embrionarios que se infiltran en la circulación sanguínea materna. Sin embargo, al ser muy escasas, tales células deben experimentar expansión celular antes de su análisis. Por tanto, la presente invención ofrece medios para expandir células embrionarias para diagnóstico prenatal.

25 Terapia génica: Para lograr una terapia génica a largo plazo satisfactoria, una alta frecuencia de células madre transducidas que han integrado el transgén en su genoma es un requisito obligatorio. En el tejido de MO, mientras que la mayoría de las células son precursores y progenitores en reproducción, las células madre constituyen sólo una pequeña fracción de la población de células y la mayoría de ellas están en un estado quiescente, sin reproducción.

30 Los vectores basados en virus (por ejemplo, retrovirus) requieren división celular activa para la integración del transgén en el genoma del huésped. Por estos motivos, la transferencia génica en células madre de MO nuevas es muy ineficaz. La capacidad para expandir una población purificada de células madre y para regular su división celular *ex vivo* permitiría un aumento de la probabilidad de su transducción (9).

Inmunoterapia adoptiva: Se han estudiado subpoblaciones de linfoides definidas, expandidas *ex vivo*, y se han usado para inmunoterapia adoptiva de diversos tumores malignos, inmunodeficiencia, enfermedades virales y genéticas (10-12).

35 El tratamiento potencia la respuesta inmunitaria requerida o sustituye funciones deficientes. Este enfoque lo aplicó por primera vez clínicamente Rosenberg *et al.* (13) usando un gran número de células T citotóxicas no específicas expandidas *ex vivo*, y posteriormente linfocitos que se infiltran en tumores específicos expandidos *ex vivo*.

40 Se mostró también que pueden hacerse crecer células presentadoras de antígenos funcionalmente activas a partir de una población de partida de células de SP CD<sub>34</sub><sup>+</sup> en cultivos mantenidos con citocinas. Estas células pueden presentar antígenos de proteínas solubles a células T autólogas *in vitro* y, por tanto, ofrecen nuevas posibilidades para la inmunoterapia de enfermedad residual mínima tras quimioterapia de alta dosis. También se estudió la expansión *ex vivo* de células dendríticas presentadoras de antígenos (14-16).

Expansión *ex vivo* de células progenitoras y madre no hematopoyéticas: Por ejemplo, expansión *ex vivo* de células madre neurales o progenitores de oligodendrocitos.

45 Los trastornos de la mielina forman un importante grupo enfermedades neurológicas humanas que son aún incurables. El progreso en modelos animales, particularmente en el trasplante de células del linaje de oligodendrocitos, ha dado como resultado una remielinización focal significativa y pruebas fisiológicas de restauración de la función (36). Futuras terapias podrían implicar tanto el trasplante como la estimulación de la reparación endógena, y los dos enfoques podrían combinarse con la manipulación *ex vivo* del tejido del donante.

50 La patente estadounidense número 5.486.359 enseña células madre mesenquimatosas humanas aisladas que pueden diferenciarse en más de un tipo de tejido (por ejemplo hueso, cartílago, músculo o estroma de la médula) y un método para aislar, purificar y expandir en cultivo células madre mesenquimatosas humanas.

55 La patente estadounidense número 5.736.396 enseña métodos para la inducción *in vitro* o *ex vivo* de linaje dirigido de células madre mesenquimatosas humanas expandidas en cultivo, aisladas que comprenden las etapas de poner en contacto las células madre mesenquimatosas con un factor bioactivo eficaz para inducir la diferenciación de las mismas en un linaje de elección. Además, se da a conocer un método que también incluye la introducción de tales

células madre mesenquimotoras de linaje inducido en un huésped a partir del cual se han originado para fines de reparación o regeneración de tejido mesenquimatoso.

La patente estadounidense número 4.642.120 enseña composiciones para reparar defectos de cartílago y huesos. Estas se proporcionan en forma de gel o bien como tales, o bien incrustadas en huesos naturales o artificiales. El gel comprende ciertos tipos de células. Estas pueden ser condrocitos embrionarios comprometidos o cualquier clase de células de origen mesenquimal que pueden convertirse potencialmente en células de cartílago, generalmente por la influencia de factores inductores condrogénicos, en combinación con fibrinógeno, antiproteasa y trombina.

La patente estadounidense número 5.654.186 enseña que células mesenquimatosas transportadas por la sangre que proliferan en cultivo, e *in vivo*, tal como se demuestra en modelos animales, pueden migrar a sitios de heridas a partir de la sangre para formar piel.

La patente estadounidense número 5.716.411 enseña un método de regeneración de la piel de una herida o quemadura en un animal o ser humano. Este método comprende las etapas de cubrir inicialmente la herida con una matriz de colágeno-glicosaminoglicano, permitir la infiltración de la matriz de GC injertada mediante células mesenquimatosas y vasos sanguíneos desde el tejido subyacente sano y aplicar una lámina de autoinjerto epitelial cultivada hecha crecer a partir de células epidérmicas extraídas del animal o ser humano en un sitio libre de heridas en la superficie corporal del animal o ser humano. El injerto resultante tiene excelentes tasas de captación y tiene el aspecto, crecimiento, maduración y diferenciación de la piel normal.

La patente estadounidense número 5.716.616 enseña métodos de tratamiento de pacientes que padecen una enfermedad, trastorno o estado caracterizado por defectos pulmonares o de cartílago óseo. Los métodos comprenden la etapa de administración intravenosa de células estromales aisladas de individuos singénicos normales o la administración intravenosa de células estromales aisladas del paciente posteriormente a la corrección del defecto genético en las células aisladas. También se dan a conocer métodos de introducción de genes en un individuo receptor. Los métodos comprenden las etapas de obtener una muestra de médula ósea de o bien el individuo receptor o bien un donante singénico compatible, aislar células adherentes de la muestra, transfectar las células adherentes que se aislaron del receptor o un donante singénico compatible con un gen y administrar las células adherentes transfectadas al individuo receptor por vía intravenosa. Se dan a conocer composiciones que comprenden células estromales aisladas que incluyen genes exógenos operativamente unidos a secuencias reguladoras.

En cada uno de los ejemplos anteriores, se usan células progenitoras y madre no hemopoyéticas como fuente externa de células para reponer las células que faltan o dañadas de un órgano. Tal uso requiere expansión celular antes de la diferenciación con el fin de obtener en primer lugar la masa celular requerida. Es en esta etapa en la que el método de la presente invención puede ser altamente eficaz y útil mientras que se implementa cualquiera de los métodos dados a conocer en las patentes estadounidenses anteriores.

Ejemplos adicionales para aplicaciones tanto *ex vivo* como *in vivo*: regeneración de la piel, regeneración hepática, regeneración muscular y crecimiento óseo en osteoporosis.

Movilización de células madre de médula ósea a la sangre periférica (periferización): El descubrimiento del efecto de quelantes de metales de transición también podría aplicarse *in vivo*. Tal como se mencionó anteriormente, células madre derivadas de SP para trasplante se "recogen" mediante leucoféresis repetida tras su movilización desde la médula a la circulación mediante tratamiento con quimioterapia y citocinas (3-4).

Por supuesto, el uso de quimioterapia no es adecuado para donantes normales. La administración de quelantes de metales de transición, tales como TEPA, en el donante podría aumentar la reserva de células madre de la médula, que entonces se moviliza a la periferia mediante G-CSF endógeno o inyectado.

Leucemia: Al contrario que la hematopoyesis normal, en la leucemia, los procesos de proliferación y diferenciación no están acoplados; las células malignas no pueden diferenciarse y por consiguiente mantienen una capacidad de proliferación continua.

La comprensión de los acontecimientos moleculares que dirigen el desacoplamiento de los procesos de proliferación y diferenciación de progenitoras normales tras el agotamiento de metales de transición, en particular cobre, puede arrojar luz sobre los procesos celulares implicados en el desarrollo de la leucemia.

Estimulación de la producción de hemoglobina fetal: Se ha mostrado que el aumento de la hemoglobina fetal mejora los síntomas clínicos en pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías tales como anemia falciforme y  $\beta$ -talasemia (38).

La hemoglobina fetal, que normalmente comprende aproximadamente el 1% de la hemoglobina total, se vuelve elevada en la eritropoyesis acelerada (por ejemplo, tras una hemólisis o hemorragia aguda o administración de eritropoyetina) (35).

Se ha sugerido que este fenómeno está asociado con la aceleración del proceso de maduración/diferenciación de los precursores eritroides (37).

La administración de quelantes de metales de transición tales como TEPA a pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías puede en primer lugar aumentar y sincronizar su reserva de progenitores eritroides temprana (bloqueando la diferenciación).

5 Tras cesar la administración del fármaco y su eliminación del organismo, esta población temprana puede experimentar entonces una maduración acelerada lo que puede dar como resultado una producción elevada de hemoglobina fetal.

10 Por tanto, según la presente invención se proporciona un método de expansión de una población de células *ex vivo*, mientras que al mismo tiempo se inhibe la diferenciación de las células. El método incluye la etapa de proporcionar a las células condiciones para la proliferación celular y, al mismo tiempo, reducir la capacidad de las células para usar metales de transición, tales como cobre.

La reducción de la capacidad de las células para usar metales de transición puede efectuarse, por ejemplo, o bien mediante agotamiento de los mismos (por ejemplo, mediante quelantes adecuados) o bien mediante interferencia en su metabolismo (por ejemplo, mediante adición de iones de zinc).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibir" se refiere a ralentizar, disminuir, retrasar, prevenir o suprimir.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" se refiere a un cambio de clases relativamente generalizadas a especializadas durante el desarrollo. La diferenciación celular de diversos linajes celulares es un proceso bien documentado y no requiere una descripción adicional en el presente documento.

20 La administración del quelante de metales de transición y/o iones de zinc puede ser mediante una composición farmacéutica que incluye los mismos, que puede incluir además espesantes, portadores, tampones, diluyentes, agentes tensioactivos, conservantes y similares, todos tal como se conoce bien en la técnica.

25 La composición farmacéutica puede administrarse o bien de una o bien de más maneras dependiendo de si se elige tratamiento local o sistemático, y del área que va a tratarse. La administración puede realizarse por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intranasal), por vía oral, mediante inhalación o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso o inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir, pero no se limitan a, lociones, ungüentos, geles, cremas, supositorios, colirios, líquidos, aerosoles y polvos. Pueden necesitarse o desearse portadores farmacéuticos, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares convencionales.

30 Las composiciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, sobres, cápsulas o comprimidos. Pueden desearse espesantes, diluyentes, aromatizantes, adyuvantes de dispersión, emulsionantes o aglutinantes.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir, pero no se limitan a, disoluciones estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados.

35 La dosificación depende de la gravedad y la receptividad del estado que va a tratarse, pero normalmente será de una o más dosis al día, durando con ciclo de tratamiento desde varios días hasta varios meses o hasta que se efectúa la cura o se logra una disminución del estado patológico. Los expertos habituales en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Un régimen de administración de liberación lenta puede ser ventajoso en algunas aplicaciones.

40 Según la presente invención, las células que van a expandirse están presentes *ex vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "*ex vivo*" se refiere a células extraídas de un organismo vivo y que se propagan fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término "*ex vivo*" no se refiere a células que se sabe que sólo se propagan *in vitro*, tal como diversas líneas celulares (por ejemplo, HL-60, HeLa, etc.).

45 Proporcionar a las células que se han hecho crecer *ex vivo* condiciones para la proliferación celular incluye proporcionar a las células nutrientes y preferiblemente una o más citocinas. De nuevo, la reducción de la capacidad de las células para usar metales de transición, tales como cobre, se efectúa mediante un quelante de metales de transición adecuado y/o iones de zinc.

50 Las concentraciones finales del quelante y/o los iones de zinc pueden estar, dependiendo de la aplicación específica, en los intervalos micromolar o milimolar. Por ejemplo, dentro de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, preferiblemente dentro de aproximadamente 4 mM a aproximadamente 50 mM, más preferiblemente dentro de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM.

El quelante puede ser un agente quelante de poliamina, tal como, pero sin limitarse a etilendiamina,

trietilentetramina, tetraetilenpentamina, pentaetilenhexamina, captopril o penicilamina, preferiblemente tetraetilpentamina.

Los quelantes enumerados anteriormente se conocen por su alta afinidad hacia iones de cobre. Sin embargo, estos quelantes también tienen una afinidad sustancial hacia otros metales de transición (39).

- 5 Según otra realización preferida de la invención, las citocinas son citocinas de acción temprana, tales como, pero sin limitarse a, factor de células madre, ligando FLT3, interleucina 6, trombopoyetina e interleucina 3, y/o citocinas de acción tardía, tales como, pero sin limitarse a, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

Las células son células hematopoyéticas.

- 10 Dependiendo de la aplicación, pueden obtenerse células hematopoyéticas para la expansión *ex vivo* según el método de la presente invención a partir de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical neonatal.

Preferiblemente, las células hematopoyéticas están enriquecidas en células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hemopoyéticas (es decir, células madre). El enriquecimiento de la fracción de células madre puede efectuarse mediante clasificación celular, tal como se conoce bien en la técnica.

- 15 Las células expandidas según la presente invención pueden ser o bien células madre indiferenciadas o bien células progenitoras comprometidas. Se conocen células madre para muchos linajes celulares. Estas células se caracterizan por ser las células más indiferenciadas del linaje. Por otro lado, las células progenitoras están más diferenciadas, puesto que ya se han comprometido a una ruta de diferenciación dentro del linaje celular.

- 20 Además según la presente invención, se proporciona un método de transducción (transfección, transformación) de células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas indiferenciadas, expandidas, o que se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

Los métodos de transducción se conocen bien en la técnica y no requieren una descripción adicional en el presente documento. Se encuentran ejemplos de protocolos de transducción en muchos manuales de laboratorio incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring.

- 25 Además según la presente invención, se proporciona una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas tal como se caracteriza adicionalmente en las reivindicaciones.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitativa.

### Ejemplo 1

- 30 ***Procedimientos experimentales***

**Selección de células CD<sub>34</sub>**: Se recubrieron células de "capa leucocítica" de sangre periférica derivadas de una unidad de sangre completa, células de sangre periférica obtenidas tras leucoféresis, o células de sangre de cordón, sobre Ficoll-Hypaque (densidad de 1,077 g/ml) y se centrifugaron a 1.000 x g durante 20 min. a temperatura ambiente. Se recogió la capa entre las fases de células mononucleares, se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato libre de Ca/Mg que contenía un 1% de albúmina sérica bovina (BSA). Se incubaron las células durante 30 min. a 4°C con anticuerpo murino monoclonal anti-CD<sub>34</sub> (0,5 µg/10<sup>6</sup> células mononucleares) y posteriormente se aislaron usando el aparato miniMACS (Miltenyi-Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania) según el protocolo del fabricante.

- 40 **Procedimientos de cultivo**: Para la expansión de células progenitoras, se sembraron fracciones enriquecidas en CD<sub>34</sub><sup>+</sup> o células mononucleares no separadas a aproximadamente 1-3x10<sup>4</sup> células/ml o bien en medio esencial mínimo alfa que contenía un 10% de suero de ternero fetal preseleccionado (FCS) (ambos de GIBCO, Grand Island, NY), o bien en medio libre de suero (medio Progenitor-34, Life Technologies, Grand Island, NY). Se complementaron los medios con una mezcla de factores de crecimiento y quelantes de metales de transición. Se incubaron los cultivos a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% CO<sub>2</sub> en aire con humedad complementaria. Se cambió la mitad del medio semanalmente por medio nuevo que contenía todos los complementos.

- 45 **Evaluaciones del potencial de clonación**: Se sometió a ensayo el potencial de clonación de células desarrolladas en el cultivo líquido, a diferentes intervalos, en medio semisólido. Se lavaron las células y se sembraron en placa de 35 mm en medio alfa que contenía metilcelulosa complementado con factores de crecimiento recombinantes (SCF, G-CSF, GM-CSF y EPO). Tras una incubación de 2 semanas, se puntuaron los cultivos con un microscopio invertido. Se clasificaron las colonias como blastocitos, mixtas, eritorides, mieloides y megacariocíticas, según su composición celular.

- 50 **Evaluación morfológica**: Con el fin de caracterizar las poblaciones de cultivo resultantes, se depositaron alícuotas de células sobre un portaobjetos de vidrio (citocentrífuga, Shandon, Runcorn, R.U.), se fijaron y se tiñeron en May-

Grunwald Giemsa. Se tiñeron otras alícuotas mediante bencidina para determinar la hemoglobina intracelular.

**Tinción de inmunofluorescencia:** A diferentes intervalos, se sometieron a ensayo células de los cultivos líquidos para determinar el antígeno CD<sub>34</sub>. Se recogieron alícuotas, se lavaron y se incubaron en hielo con anticuerpo monoclonal anti-CD45 marcado con FITC y o bien anticuerpo monoclonal anti-CD<sub>34</sub> (HPCA-2) marcado con PE o bien Ig de ratón de control marcada con PE. Tras la incubación, se lisaron los glóbulos rojos con disolución de lisado, mientras que las células restantes se lavaron y se analizaron mediante citómetro de flujo.

**Citometría de flujo:** Se analizaron las células y se clasificaron usando un citómetro de flujo FACStar<sup>plus</sup> (Becton-Dickinson, Immunofluorescence systems, Mountain View, CA). Se hicieron pasar las células a una tasa de 1.000 células/segundo a través de una boquilla de 70 µm, usando solución salina como fluido de envolvente. Un haz de láser de argón de 488 nm a 250 mW sirvió como fuente de luz para la excitación. Se midió la fluorescencia verde (derivada de FITC) usando un filtro de 530±630 nm de paso de banda y la fluorescencia roja (derivada de PE) (usando un filtro de 575±626 nm de banda). Se fijaron los PMT al voltaje apropiado. Se aplicó una amplificación logarítmica para las mediciones de fluorescencia y una amplificación lineal para la dispersión de la luz directa. Se analizaron al menos 10<sup>4</sup> células.

## Ejemplo 2

### Resultados experimentales

En un esfuerzo por desarrollar condiciones de cultivo que estimulen la proliferación e inhiban la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, se cultivaron células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> con los siguientes complementos:

quelantes de metales de transición tales como tetraetilpentamina (TEPA), captopril (CAP) penicilamina (PEN) u otros quelantes o iones tales como zinc que interfieren con el metabolismo de metales de transición;

citocinas de acción temprana - factor de células madre (SCF), ligando FLT3 (FL), interleucina 6 (IL-6), trombopoyetina (TPO) e interleucina 3 (IL-3);

citocinas de acción tardía - factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y eritropoyetina (EPO).

**Efectos de TEPA sobre la proliferación y la capacidad de clonación de cultivos de CD<sub>34</sub><sup>+</sup> a corto plazo:** La adición de TEPA a células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cultivadas con bajas dosis de citocinas de acción temprana dio como resultado un aumento significativo del número de células totales, del número de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (medido mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos marcados con fluorescencia, figura 2) y de la capacidad de clonación de las células (medido mediante siembra en placa de alícuotas de cultivo en medio semisólido y puntuación de colonias que se desarrollan dos semanas más tarde, figura 1), en comparación con cultivos complementados sólo con citocinas. Las colonias que se desarrollaron en medio semisólido en presencia de TEPA fueron de fenotipo mielóide, eritroide y mixto.

Se evaluaron adicionalmente los efectos de TEPA en cultivos complementados o bien con dosis altas de citocinas tempranas (tabla 1) o bien con una combinación de citocinas de acción temprana y tardía (figura 3). Los resultados indicaron que TEPA aumentó significativamente la capacidad de clonación y el porcentaje de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> en estos cultivos. En cuanto al número de células totales, se aumentó mediante TEPA en cultivos complementados con citocinas tempranas (tabla 1; figura 2), mientras que en cultivos complementados tanto con citocinas tempranas como tardías, TEPA provocó una inhibición marginal (figura 3).

TABLA 1

El efecto a corto plazo de TEPA sobre células CD<sub>34</sub>

TEPA	Il-3	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células CD <sub>34</sub> (%)	Colonias (por 1x10 <sup>3</sup> células iniciadoras)	Expansión de CFU (veces)
-	-	1	1	16	0,3
+	-	2	11,5	140	2,8
-	+	5	5	165	3,3
+	+	11	20	850	17

Se sembraron en placa células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre de cordón en cultivo líquido en presencia de: ligando FLT3 – 50 ng/ml, SCF – 50 ng/ml, IL-6 – 50 ng/ml, con o sin IL-3 – 20 ng/ml, con o sin TEPA - 10 µM. En el día 7, se determinó el porcentaje de células CD<sub>34</sub> y el número de células totales. Se sometieron a ensayo alícuotas equivalentes a 1x10<sup>3</sup> células iniciadoras en los días 0 y 7 para determinar las células formadoras de colonias (CFU) mediante clonación en medio semisólido. La expansión de CFU representa la razón de CFU presentes en el día 7 con respecto a las CFU presentes en el día 0.

**Efectos de TEPA sobre la proliferación y capacidad de clonación de cultivos de CD<sub>34+</sub> a largo plazo:** Se mantuvieron cultivos a largo plazo durante 3-5 semanas mediante semidespoblación semanal (se retiró la mitad del volumen del cultivo y se sustituyó por medio nuevo y citocinas). La adición de TEPA dio como resultado una capacidad de clonación superior en cultivos a largo plazo complementados o bien con citocinas tempranas (figura 4) o bien con citocinas tanto tempranas como tardías (figura 3), en comparación con cultivos complementados sólo con citocinas.

Tras tres semanas en cultivo, hubo una repentina disminución en la capacidad de clonación en cultivos complementados sólo con citocinas, mientras que los cultivos tratados con TEPA en combinación con citocinas mantuvieron una alta capacidad de clonación, que era incluso superior a la de cultivos a corto plazo.

**El efecto de TEPA sobre la maduración de células hematopoyéticas:** Se sometió a prueba el efecto de TEPA sobre la maduración de células hematopoyéticas en varios modelos:

**Células eritroleucémicas de ratón (MEL):** Las células MEL son células de tipo eritroblasto. Tras el tratamiento con varios productos químicos (inductores de diferenciación) las células experimentan diferenciación eritroide y acumulan hemoglobina. Se cultivaron células MEL en presencia del inductor de diferenciación hexametilén-bisacetamida (HMBA) y los quelantes TEPA o captopril. En el día 3 del cultivo, se determinó el número total de células y el porcentaje de células que contenían hemoglobina (tabla 2). Los resultados indican que tanto TEPA como captopril inhibieron la diferenciación inducida por HMBA de células MEL.

**Cultivos de células eritroides humanas:** Se hicieron crecer células eritroides humanas normales según el procedimiento de cultivo líquido de dos fases, esencialmente tal como se describe en las referencias 23-26. En la primera fase, se incubaron células mononucleares de sangre periférica en presencia de factores de crecimiento temprano durante 5-7 días. En la segunda fase, se sustituyeron esos factores por el factor de proliferación/diferenciación específico eritroide, eritropoyetina.

Se complementaron los cultivos con TEPA al inicio de la segunda fase. Se determinó el número de células totales y el porcentaje de células que contenían hemoglobina tras 14 días. Los resultados (figura 5) mostraron que en presencia de TEPA había una repentina disminución de células que contenían hemoglobina, mientras que el número total de células sólo disminuyó ligeramente.

Estos resultados sugieren que TEPA inhibe la diferenciación eritroide, pero no afecta significativamente a la capacidad de proliferación de las células progenitoras.

TABLA 2

El efecto de TEPA y captopril sobre el crecimiento y la diferenciación de células de eritroleucemia

	Células/ml ( $\times 10^4$ )	Células positivas para bencidina (%)
Control	31	<1
HMBA	32	46
HMBA + TEPA 5 $\mu$ M	35	24
HMBA + TEPA 10 $\mu$ M	35	16
HMBA + TEPA 20 $\mu$ M	47	16
HMBA + Captopril 20 $\mu$ M	34	29
HMBA + Captopril 40 $\mu$ M	34	12

Se cultivaron células de eritroleucemia murinas (MEL) en medio líquido complementado con el inductor de diferenciación, hexametilén-bisacetamida (HMBA, 4 mM), con o sin diferentes concentraciones de TEPA o captopril. En el día 3, se determinó el número de células totales y las células que contenían hemoglobina (positivas para bencidina).

**Cultivos iniciados por CD<sub>34+</sub>:** Se mantuvieron cultivos líquidos a largo plazo iniciados con células CD<sub>34+</sub> con diferentes cócteles de citocinas. La mitad de los cultivos se complementaron continuamente con TEPA. Con el fin de someter a prueba el estado de la diferenciación celular, se tiñó la preparación de citospina con May-Grunwald Giemsa (figuras 6a-d). Los resultados mostraron que los cultivos que se mantuvieron durante 4-5 semanas sin TEPA sólo contenían células completamente diferenciadas, mientras que con TEPA los cultivos contenían, además de células completamente diferenciadas, un subconjunto del 10% - 40% de células de tipo blastocitos indiferenciadas.

Estos resultados sugieren fuertemente que TEPA induce un retraso en la diferenciación de células CD<sub>34+</sub> lo que da como resultado una prolongación de la proliferación y acumulación de células progenitoras tempranas en cultivos ex vivo a largo plazo.

**Mecanismo de actividad de TEPA:** con el fin de determinar si TEPA afecta a las células CD<sub>34+</sub> mediante agotamiento de metales de transición, tales como cobre, se adoptaron dos enfoques.

El primero fue evaluar el efecto de diferentes quelantes de metales de transición: tetra-etilpentamina (TEPA), captopril (CAP) o penicilamina (PEN). Los resultados demostraron que todos estos compuestos comparten los mismos efectos sobre células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> que TEPA (figura 7).

5 El segundo enfoque fue complementar cultivos tratados con TEPA con cobre. Los resultados indicaron que las actividades de TEPA se invirtieron mediante cobre (figura 8), mientras que la complementación con otros iones, tales como hierro y selenio, no lo hizo (figura 9), al menos en los cultivos de corto a medio plazo empleados en el presente documento.

10 El zinc, que se sabe que interfiere con el metabolismo de metales de transición, por ejemplo, con el metabolismo del cobre, expande la capacidad de clonación de los cultivos en sí mismo. Este efecto fue incluso más pronunciado en presencia tanto de zinc como de TEPA (figura 10).

15 En los ejemplos anteriores se demuestra que complementando cultivos de células CD<sub>34</sub> con citocinas de acción temprana y el agente de poliamina, tetraetilenpentamina (TEPA), por ejemplo, es posible mantener cultivos a largo plazo (LTC) sin el soporte del estroma. Tres fenómenos resultaron evidentes en estos cultivos: (i) proliferación celular continua; (2) expansión de células clonogénicas (CFUc); y (iii) mantenimiento de células en su estado indiferenciado.

En cambio, los cultivos control, no tratados con TEPA dejaron de proliferar y generar CFUc y sus células experimentaron diferenciación mucho antes.

Por tanto, TEPA y otros quelantes de metales de transición mantienen cultivos a largo plazo inhibiendo/retrasando la diferenciación celular mediante quelación de metales de transición, cobre en particular.

20 El siguiente ejemplo n.º 3 sustancia adicionalmente los resultados descritos anteriormente en el presente documento; enseña condiciones de cultivo óptimas para cultivos a largo plazo, enseña agentes quelantes adicionales que afectan a la diferenciación de células hemopoyéticas y arroja más luz sobre el mecanismo de actividad de TEPA y otros quelantes sobre sus células diana.

### Ejemplo 3

25 Se purificaron células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> derivadas de sangre de cordón neonatal humana mediante un método inmunomagnético y después se cultivaron en medio líquido complementado con citocinas o bien con o bien sin quelantes de metales de transición. A intervalos semanales, se semi-despoblaron los cultivos retirando la mitad del contenido del cultivo (sobrenadante y células) y sustituyéndolo con medio nuevo, citocinas y los quelantes. En las semanas indicadas se cuantificó el contenido celular de los cultivos para determinar las células totales (mediante un método hemocitométrico/microscópico manual), para determinar células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (mediante inmuno-citometría de flujo) y para determinar células clonogénicas (clonando las células en medio semi-sólido complementado con citocina). Se iniciaron los cultivos con 1x10<sup>4</sup> células, el 50-80% de las cuales eran CD<sub>34</sub><sup>+</sup> y el 25-50% de las cuales eran CFUc. Los resultados presentados en las figuras 11 a 24 se calcularon por 1x10<sup>4</sup> células iniciadoras (los números se multiplicaron por los factores de dilución).

35 La figura 11 muestra el efecto de TEPA sobre cultivos de CD<sub>34</sub> a largo plazo. Los cultivos iniciados con células CD<sub>34</sub> en medio líquido complementado con citocinas de acción temprana (en ausencia de células del estroma) podían mantenerse mediante TEPA durante mucho tiempo (>6 semanas). En tales cultivos, TEPA soportó, en combinación con las citocinas, el mantenimiento y la expansión de células clonogénicas (CFUc): los cultivos se iniciaron con 2,5x10<sup>3</sup> CFUc. Tras finalizar las 6 semanas, los cultivos tratados con TEPA contenían 300x10<sup>3</sup> CFUc, (es decir, una expansión de 120 veces) mientras que los cultivos control no contenían ninguna CFUc.

40 Las figuras 12-14 muestran el efecto de TEPA sobre la proliferación celular, CFUc y frecuencia de CFUc en presencia de diferentes combinaciones de citocinas tempranas. Se encontró que la combinación de las citocinas de acción temprana TPO, SCF, ligando FLT3 IL-6 y TEPA era la combinación óptima para el mantenimiento y la expansión a largo plazo de células con potencial clonogénico.

45 La figura 15 muestra el efecto de G-CSF y GM-CSF sobre la frecuencia de CFUc de cultivos de CD<sub>34</sub> complementados con TEPA y control. Complementar los cultivos con las citocinas de acción tardía G-CSF y GM-CSF, que estimulan la diferenciación celular, dieron como resultado una rápida pérdida de células clonogénicas. Este efecto estimulante de la diferenciación se bloquea mediante TEPA.

50 Las figuras 16-17 muestran el efecto de cambio de medio + TEPA parcial o completo sobre la proliferación celular a largo plazo (figura 16) y la producción de CFUc (figura 17). Los resultados obtenidos indican que para mantener una expansión máxima, debe sustituirse completamente TEPA, al menos, a intervalos semanales.

La figura 19 muestra el efecto de la adición retrasada de TEPA sobre la frecuencia de CFUc. Resulta evidente que la exposición temprana de células CD<sub>34</sub> a TEPA fue crucial para el mantenimiento a largo plazo y la expansión de CFUc, lo que sugiere que TEPA afecta a la diferenciación de progenitores en diversas fases de diferenciación.

La figura 20 muestra el efecto de la preincubación a corto plazo con una única citocina sobre la producción de CFUC a largo plazo. Los resultados indican que los LTC-CFC se conservan más en cultivos tratados con TEPA cuando se complementan durante las primeras 24 horas con una única citocina en vez del complemento completo de citocinas, lo que sugiere que en las primeras condiciones las células se bloquean más eficazmente.

5 Las figuras 21 a-b muestran el efecto de agentes quelantes de poliamina sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. Los agentes quelantes de poliamina mantenían la proliferación celular y expandían la CFUC durante cultivos a largo plazo. Entre los compuestos sometidos a prueba, se encontró que las poliaminas de cadena larga, TEPA y PEHA, eran más eficaces que las poliaminas de cadena corta.

10 Las figuras 22a-b muestran en efecto de agentes quelantes de metales de transición sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. Penicilamina (PEN) y captopril (CAP), que son quelantes de metales de transición conocidos, mantenían la proliferación celular y la expansión de células clonogénicas durante cultivos a largo plazo.

La figura 23a-b muestra el efecto del zinc sobre cultivos de células CD<sub>34</sub>. El zinc, que se sabe que interfiere con el metabolismo de metales de transición, cobre en particular, imitaba el efecto de los agentes quelantes en cultivos a largo plazo, pero en un menor grado que los propios quelantes.

15 Por tanto, la expansión *ex vivo* de células progenitoras hematopoyéticas se ve limitada por la evolución de estas células a células diferenciadas que no se dividen. Este proceso de diferenciación puede retrasarse cultivando las células progenitoras sobre una capa de células estromales. Puesto que el estroma mantiene una proliferación celular continua y generación a largo plazo de CFUC, se cree que el estroma ocasiona un efecto antidiferenciación sobre las células progenitoras.

20 Se ha desarrollado un sistema novedoso que mantiene una proliferación celular continua y generación a largo plazo de CFUC en cultivos libres de estroma (figura 11). El sistema combina el uso de citocinas de acción temprana, tales como factor de células madre (SCF), ligando FLT3, interleucina 6 (IL-6), trombopoyetina (TPO) con o sin interleucina 3, y agentes quelantes de metales de transición (figuras 12-14). Las citocinas tempranas mantienen la supervivencia y proliferación de los progenitores con estímulo reducido para la diferenciación en comparación con citocinas de acción tardía, tales como G-CSF y GM-CSF (figura 15). Los quelantes inhiben la diferenciación a través de la quelación de metales de transición, cobre en particular. El cambio de medio completo a intervalos semanales, en comparación con cambio parcial, mejoró el mantenimiento de LTC-CFC, lo que sugiere que el complejo TEPA-metal de transición, por ejemplo, complejo TEPA-cobre, puede no ser estable (figuras 16-17).

30 Varios conjuntos de pruebas sugieren que TEPA inhibe la diferenciación de progenitores tempranos (figura 18). Por ejemplo, cuando se retrasó la adición de TEPA hasta el día 6 del cultivo, sus efectos se redujeron en comparación con cultivos complementados con TEPA desde el día 1 (figura 19).

35 Aunque se obtuvieron resultados óptimos cuando se añadió TEPA en el día 1, era ventajoso añadir el complemento completo de citocinas en el día 2. Por tanto, los cultivos tratados con TEPA que se complementaron durante un día con sólo una citocina, por ejemplo, ligando FLT3 seguido por la adición de las otras citocinas (SCF, TPO e IL-3) se mantuvieron durante más tiempo que los cultivos en los que se añadieron todas las citocinas en el día 1 (figura 20). Se plantea la hipótesis de que puesto que la diferenciación celular está dirigida por las citocinas y depende del cobre y otros metales de transición, la inhibición de la diferenciación requiere el agotamiento de los mismos antes de la exposición al complemento completo de citocinas. Una única citocina no mantiene una activación rápida (proliferación y diferenciación) pero mantiene la viabilidad celular, permitiendo así que TEPA quele eficazmente los metales de transición en células CD<sub>34</sub> indiferenciadas quiescentes antes de la activación.

40 Tras el examen, se ha encontrado que diversos agentes quelantes mantienen una proliferación celular continua y generación a largo plazo de CFUC y retrasan la diferenciación celular. Entre ellos están las poliaminas tales como, pero sin limitarse a, TEPA, EDA, PEHA y TETA (figuras 21a-b) o quelantes tales como, pero sin limitarse a, penicilamina (PEN) y captopril (CAP) (figuras 22a-b). El zinc que interfiere con el metabolismo de metales de transición (cobre en particular) también mantenía los LTC-CFC (figuras 23a-b).

#### Ejemplo 4

50 Se describe además en el presente documento un método de conservación de células madre, tales como, pero sin limitarse a, células madre derivadas de sangre del cordón, células madre derivadas de sangre periférica y células madre derivadas de médula ósea. El método se efectúa manipulando las células madre mientras que se recogen, aíslan y/o almacenan, en presencia de un quelante de metales de transición, por ejemplo, TEPA.

Se recogieron células derivadas de sangre del cordón y se almacenaron (sin separar) durante 24 horas, a 4°C, o bien en presencia o bien en ausencia de TEPA 10 µM. Entonces se separaron células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> usando o bien tampón TEPA-PBS 10 µM o bien tampón PBS libre de TEPA, respectivamente. Entonces, se hicieron crecer las células en cultivos a largo plazo en presencia de TEPA 10 µM.

55 Los resultados indicaban que los cultivos que se iniciaron con células que se manipularon en presencia de TEPA se expandieron durante 8 semanas, mientras que los cultivos iniciados a partir de células almacenadas sin TEPA

detuvieron su expansión tras sólo 5 semanas.

Se sabe bien que se tarda habitualmente al menos varias horas entre la recogida de las células y o bien su congelación o bien su trasplante.

5 Estos resultados indican que la adición de un quelante de metales de transición, tal como TEPA, a las bolsas de recogida y los tampones de separación y lavado aumentan el rendimiento de células madre y mejoran su potencial de crecimiento a largo plazo, facilitando por tanto la captación a corto plazo y la repoblación a largo plazo tras el trasplante de células hemopoéticas o bien "nuevas", crioconservadas o bien expandidas *ex vivo*.

10 Se describen además en el presente documento bolsas de recogida y tampones de separación y lavado complementados con una cantidad o concentración eficaz de quelante de metales de transición, que inhibe la diferenciación.

**Lista de referencias citadas**

1. Van Epps DE, *et al.* Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells* 20:411, 1994.
- 15 2. Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood* 87:3082, 1996.
3. Brugger W, *et al.* Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *in vivo*. *N Engl J Med* 333:283, 1995.
4. Williams SF, *et al.* Selection and expansion of peripheral blood CD34+ cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 87:1687, 1996.
- 20 5. Zimmerman RM, *et al.* Large-scale selection of CD34+ peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications. *J Hematotherapy* 5:247, 1996.
6. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood* 82:378, 1993.
7. Lebkowski JS, *et al.* Rapid isolation and serum-free expansion of human CD34+ cells. *Blood Cells* 20:404, 1994.
- 25 8. Sandstrom CE, *et al.* Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 86:958, 1995.
9. Eiprs PG, *et al.* Retroviral infection of primitive hematopoietic cells in continuous perfusion culture. *Blood* 86: 3754, 1995.
- 30 10. Freedman AR, *et al.* Generation of T lymphocytes from bone marrow CD34+ cells in vitro. *Nature Medicine* 2: 46, 1996.
11. Heslop HE, *et al.* Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Medicine* 2:551, 1996.
12. Protti MP, *et al.* Particulate naturally processed peptides prime a cytotoxic response against human melanoma in vitro. *Cancer Res* 56:1210, 1996.
- 35 13. Rosenberg SA, *et al.* Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 622, 1993.
14. Bernhard H, *et al.* Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1099, 1995.
- 40 15. Fisch P, *et al.* Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens ex vivo from peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol* 26:595, 1996.
16. Siena S, *et al.* Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Expt Hematol* 23:1463, 1996.
17. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to F1T3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 183:2551, 1996.
- 45 18. Schwartz RM, *et al.* In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors. *Blood* 78:3155, 1991.
19. Verfaillie CM. Can human hematopoietic stem cells be cultured in vivo? *Stem Cells* 12:466, 1994.

20. Haylock DN, *et al.* Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 80:1405, 1992.
21. Brugger W, *et al.* Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 81:2579, 1993.
- 5 22. Sato N, *et al.* In vitro expansion of human peripheral blood CD34+ cells. *Blood* 82:3600, 1993.
23. Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid medium. *Blood* 73:100, 1989.
24. Fibach E, Manor D, Treves A, Rachmilewitz EA. Growth of human normal erythroid progenitors in liquid culture: A comparison with colony growth in semisolid culture. *Internatl J Cell Clon* 9:57, 1991.
- 10 25. Fibach E, Rachmilewitz EA. The two-step liquid culture - novel procedure for studying maturation of human normal and pathologic erythroid precursors. *Stem Cells* 11:36, 1993.
26. Dalyot N, Fibach E, Rachmilewitz E, Oppenheim A. Adult and neonatal patterns of human globin gene expression are recapitulated in liquid cultures. *Exper Hematol* 20:1141, 1992.
- 15 27. Banno S, *et al.* Anemia and neutropenia in elderly patients caused by copper deficiency for long-term enteral nutrition. *Rinsho-ketsueki* 35:1276, 1994.
28. Wasa M, *et al.* Copper deficiency with pancytopenia during total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18:190, 1994.
29. Zidar BL, Shaddock RK, Zeigler Z, Winkelstein A. Observation on the anemia and neutropenia of human copper deficiency. *Am J Hematol* 3:177, 1977.
- 20 30. Hirase N, *et al.* Anemia and neutropenia in a case of copper deficiency: Role of copper in normal hematopoiesis. *Acta Haematol* 87:195, 1992.
31. Percival SS, Layden-Patrice M. HL-60 cells can be made copper deficient by incubating with tetraethylenepentamine. *J Nutr* 122:2424, 1992.
32. Percival SS. Neutropenia caused by copper deficiency: possible mechanisms of action. *Nutr Rev* 53:59, 1995.
- 25 33. Bae B, Percival SS. Retinoic acid-induced HL-60 cell differentiation is augmented by copper supplementation. *J Nutr* 123:997, 1993.
34. Bae B, Percival SS. Copper uptake and intracellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells. *J Nutr Biochem* 5:457, 1994.
35. Alter BP. Fetal erythropoiesis in stress hemopoiesis. *Experimental Hematology* 7:200, 1979.
- 30 36. Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models. *Molecular Medicine Today*. Dec. 1997. págs. 554-561.
37. Blau CA *et al.* Fetal hemoglobin in acute and chronic stage of erythroid expansion. *Blood* 81:227, 1993.
38. Schechtez AN *et al.* Sick cell anemia. En: *Molecular basis of blood diseases*. Stamatoyannaopoulos G, Nienhuis AW, Leder P and Majerus PW Eds. págs. 179-218, Saunders Philadelphia.
- 35 39. Ross JW and Frant MS. Chelometric indicators, titration with the solid state cupric ion selective electrode. *Analytical Chemistry* 41:1900, 1969.
40. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 51 (2): 225-227, 1990.
41. Simon SR, *et al.* Copper deficiency and siberoblastic anemia associated with zinc ingestion. *Am J Hematol* 28 (3): 181-183, 1988.
- 40 42. Hoffman HN 2d, *et al.* Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* 94(2): 508-512, 1988.
43. Reeves PG, *et al.* High zinc concentrations in culture media affect copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *J Nutr* 126(6): 1701-1712, 1996.
44. Tashiro Itoh T, *et al.* Metallothionein expression and concentrations of copper and zinc are associated with tumor differentiation in hepatocellular carcinoma. *Liver* 17(6): 300-306, 1997.
- 45 45. Cable EE, Isom HC. Exposure of primary rat hepatocytes in long-term DMSO culture to selected transition metals

- induces hepatocyte proliferation and formation of duct-like structures. *Hepatology* 26(6): 1444-1457, 1997.
46. Kizaki M, *et al.* Regulation of manganese superoxide dismutase and other antioxidant genes in normal and leukemic hematopoietic cells and their relationship to cytotoxicity by tumor necrosis factor. *Blood* 82(4): 1142-1150, 1993.
- 5 47. Brugnera E, *et al.* Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res* 22(15): 3167-3173, 1994.
48. Heuchel R, *et al.* The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J* 13(12): 2870-2875, 1994.
- 10 49. Palmiter RD. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(4): 1219-1223, 1994.
50. Hatayama T, *et al.* Regulation of hsp70 synthesis induced by cupric sulfate and zinc sulfate in thermotolerant HeLa cells. *J Biochem Tokyo* 114(4): 592-597, 1993.
- 15 51. Filvaroff E, *et al.* Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 269(34):21735-21740, 1994.
52. Okazaki T, *et al.* Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of a 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 269(6): 4070-4077, 1994.]
- 20 53. Kim H, Lipscomb WN. Differentiation and identification of the two catalytic metal binding sites in bovine lens leucine aminopeptidase by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(11): 5006-5010, 1993.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de expansión de células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo*, mientras que al mismo tiempo se inhibe la diferenciación de dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas, comprendiendo el método proporcionar a dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex-vivo* condiciones para la proliferación celular y con un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en tetraetilenpentamina (TEPA), etilendiamina (EDA), pentaetilenhexamina (PEHA), trietilentetramina (TETA), penicilamina y captopril, en el que dichas condiciones para la proliferación celular comprenden nutrientes y al menos una citocina de acción temprana o citocinas de acción temprana, en el que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas son células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas, y en el que dicho quelante y dichas condiciones de proliferación dan como resultado
- 5 (i) proliferación activa prolongada;
- 10 (ii) expansión a largo plazo de células clonogénicas (CFUc); y
- (iii) mantenimiento de células indiferenciadas en su estado indiferenciado; con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho quelante de metales de transición es TEPA.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 0,1  $\mu$ M a 100 mM.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 4  $\mu$ M a 50 mM.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 5  $\mu$ M a 40 mM.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dichas condiciones para la proliferación celular comprenden además proporcionar una citocina de acción tardía o citocinas de acción tardías.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha citocina de acción tardía se selecciona del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.
8. Método según la reivindicación 6, en el que dicha citocina de acción tardía es factor estimulante de colonias de granulocitos.
- 30 9. Método según la reivindicación 1, en el que dichas células hematopoyéticas se derivan de una fuente seleccionada del grupo que consiste en células de médula ósea, células de sangre periférica y células de sangre de cordón umbilical neonatal.
10. Método según la reivindicación 1, en el que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas se derivan de células de sangre de cordón umbilical neonatal.
- 35 11. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de seleccionar una población de células hematopoyéticas enriquecida en células madre hematopoyéticas.
12. Método según la reivindicación 11, en el que dichas células están enriquecidas en CD34+.
13. Método de transducción de células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas indiferenciadas expandidas, con un exógeno, comprendiendo el método:
- (a) expandir e inhibir la diferenciación de dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas:
- 40 (i) proporcionando a dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas condiciones para la proliferación celular, en el que dichas condiciones para la proliferación celular comprenden nutrientes y al menos una citocina de acción temprana o citocinas de acción temprana y en el que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas son células progenitoras y madre hematopoyéticas terapéuticas;
- 45 (ii) poniendo en contacto dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas con un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, en el que dicho quelante y dichas condiciones de proliferación dan como resultado proliferación activa prolongada; expansión a largo plazo de células clonogénicas (CFUc); y mantenimiento de células indiferenciadas en su estado indiferenciado; inhibiendo de ese modo la diferenciación y expansión dichas células hematopoyéticas *ex vivo*; y
- 50 (b) transducir dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas terapéuticas, con

el exogén, con la condición de que dichas células progenitoras y madre hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha transducción se efectúa mediante un vector que incluye el exogén.
- 5 15. Población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas que comprende células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, teniendo dicha población:
- (i) una mayor proporción de células progenitoras y madre hematopoyéticas en proliferación;
  - (ii) una mayor proporción de células clonogénicas (CFUc); y
- 10 (iii) una mayor proporción de células indiferenciadas mantenidas en su estado indiferenciado
- en comparación con una población similar de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* sin contacto con dicho quelante de metales de transición con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano.
- 15 16. Método de conservación de células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas que comprende poner en contacto las células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas con un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, en el que dicho contacto se realiza en al menos una de las etapas de recogida, aislamiento y almacenamiento de las células hematopoyéticas indiferenciadas, con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano.
- 20 17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho quelante de metales de transición es TEPA.
18. Bolsas de recogida de células madre, complementadas con una cantidad de un quelante de metales de transición seleccionado del grupo que consiste en TEPA, EDA, PEHA, TETA, penicilamina y captopril, siendo dicha cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de una población de células hematopoyéticas indiferenciadas.
- 25 19. Bolsas de recogida de células madre según la reivindicación 18, en las que dicho quelante de metales de transición es TEPA.
20. Bolsas de recogida de células madre según la reivindicación 18, en las que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 0,1  $\mu$ M a 100 mM.
21. Bolsas de recogida de células madre según la reivindicación 20, en las que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 4  $\mu$ M a 50 mM.
- 30 22. Bolsas de recogida de células madre según la reivindicación 20, en las que la concentración de dicho quelante de metales de transición es de 5  $\mu$ M a 40 mM.
- 35 23. Uso de una composición de células hematopoyéticas terapéuticas que comprende una población de células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto que necesita el trasplante de células madre hematopoyéticas, en el que dicha población se caracteriza por tener:
- (i) una mayor proporción de células progenitoras y madre hematopoyéticas en proliferación;
  - (ii) una mayor proporción de células clonogénicas (CFUc); y
  - (iii) una mayor proporción de células indiferenciadas mantenidas en su estado indiferenciado
- 40 en comparación con una población similar de células progenitoras y madre hematopoyéticas *ex vivo* cultivadas sin contacto con dicho quelante de metales de transición.
24. Métodos según las reivindicaciones 1 y 13, en los que dicha al menos una citocina de acción temprana o citocinas se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando FLT3, interleucina 6, trombopoyetina e interleucina 3.
25. Métodos según las reivindicaciones 1 y 13, en los que dicha citocina de acción temprana es ligando FLT3.
- 45 26. Población de células progenitoras y madre hematopoyéticas cultivadas *ex vivo* terapéuticas que comprende células progenitoras y madre hematopoyéticas indiferenciadas expandidas según los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, proporcionándose dicha población de células en un medio que comprende dicho quelante de metales de transición con la condición de que dichas células hematopoyéticas no son células madre embrionarias humanas obtenidas de un embrión humano.

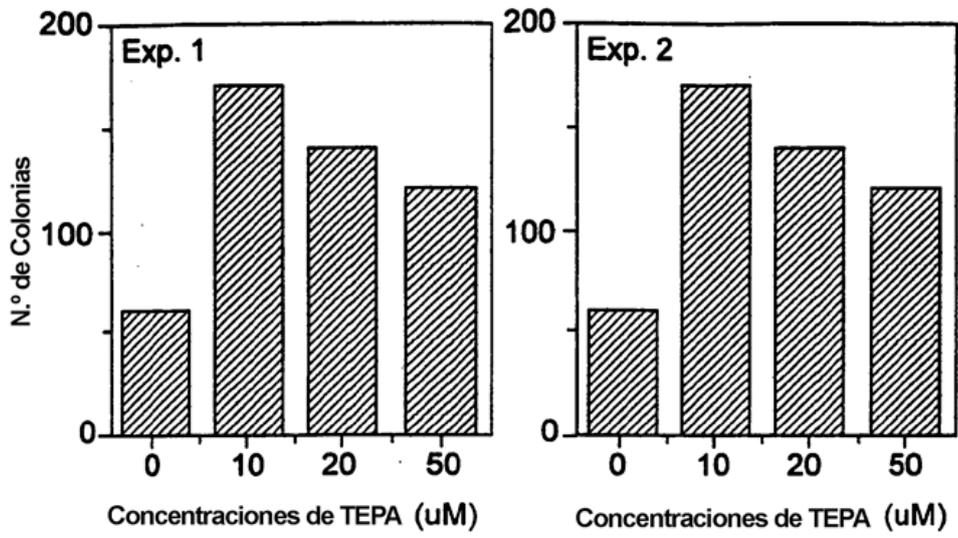


Fig. 1

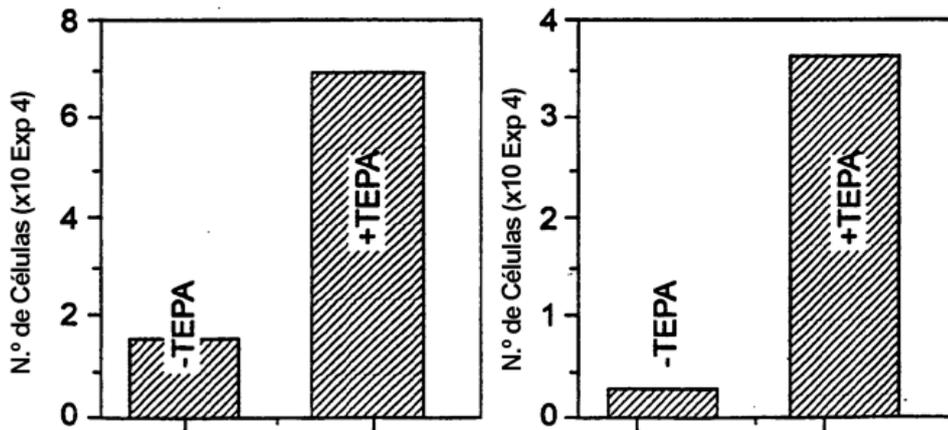


Fig. 2

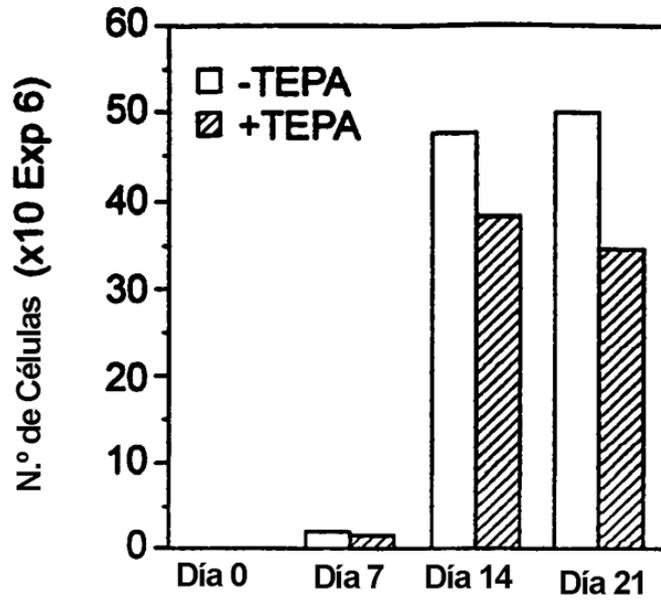


Fig. 3a

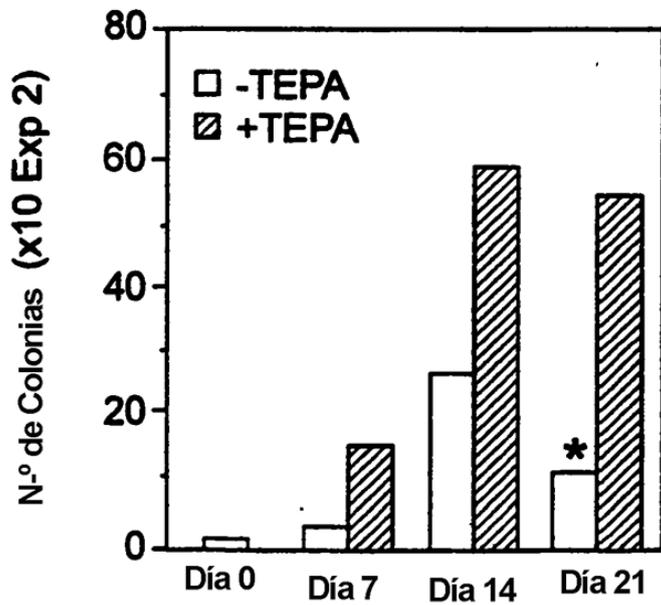


Fig. 3b

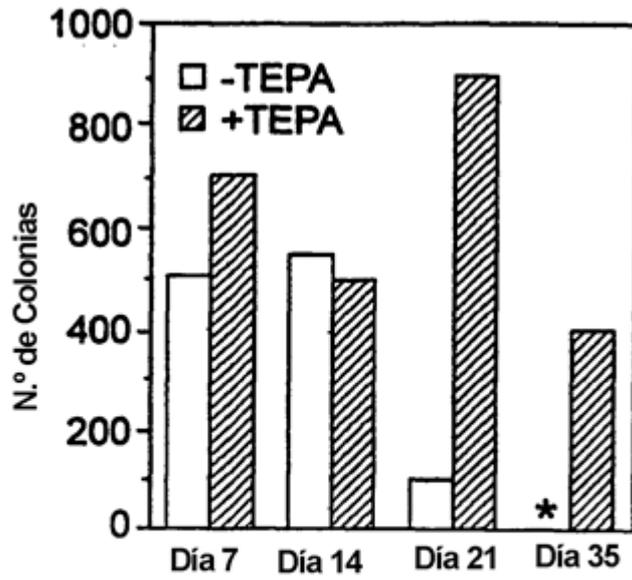


Fig. 4a

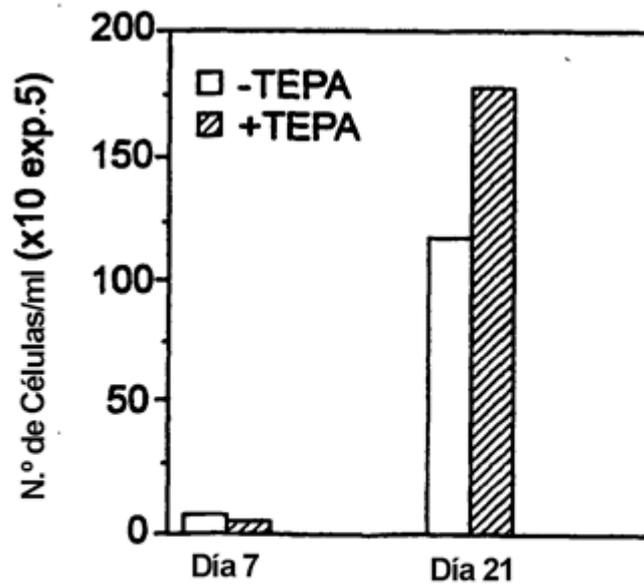


Fig. 4b

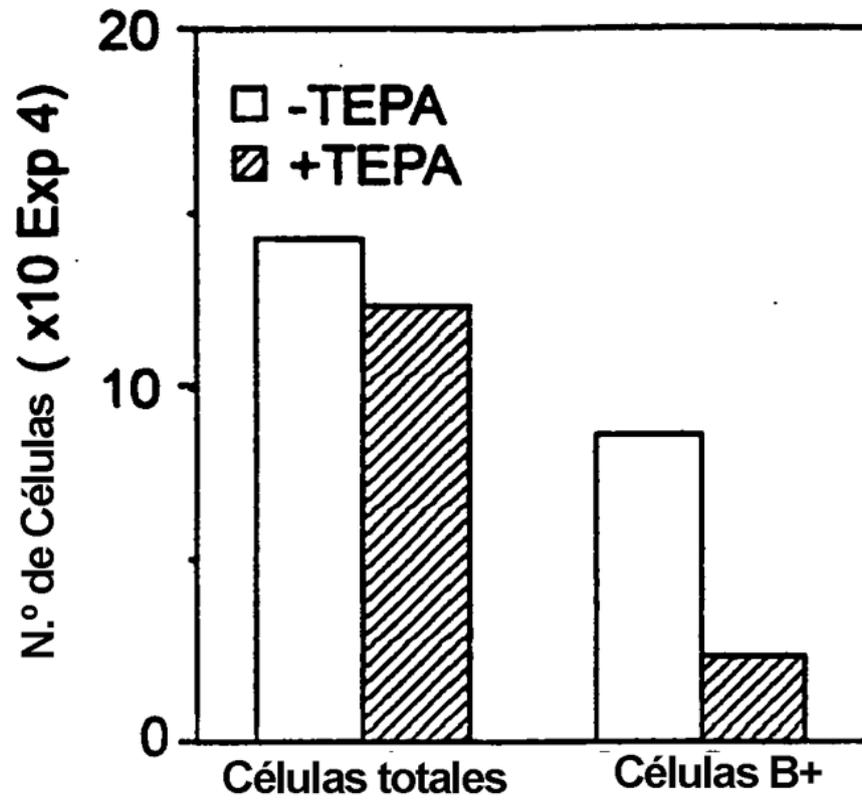


Fig. 5

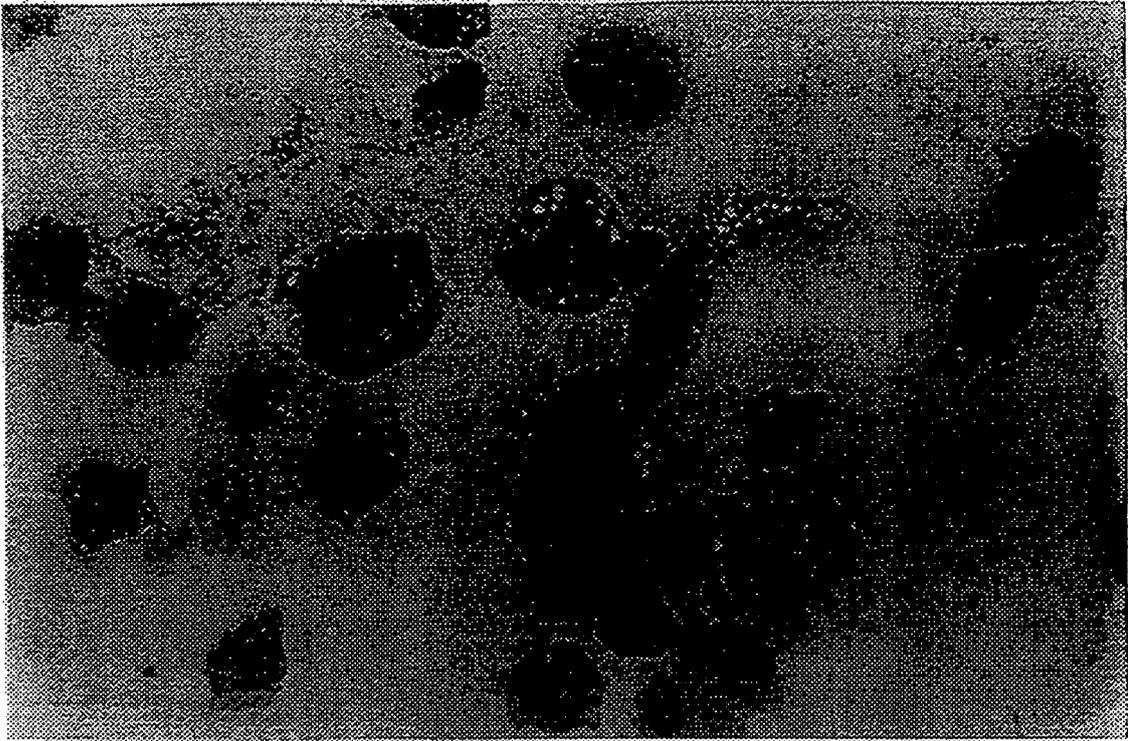


Fig. 6a

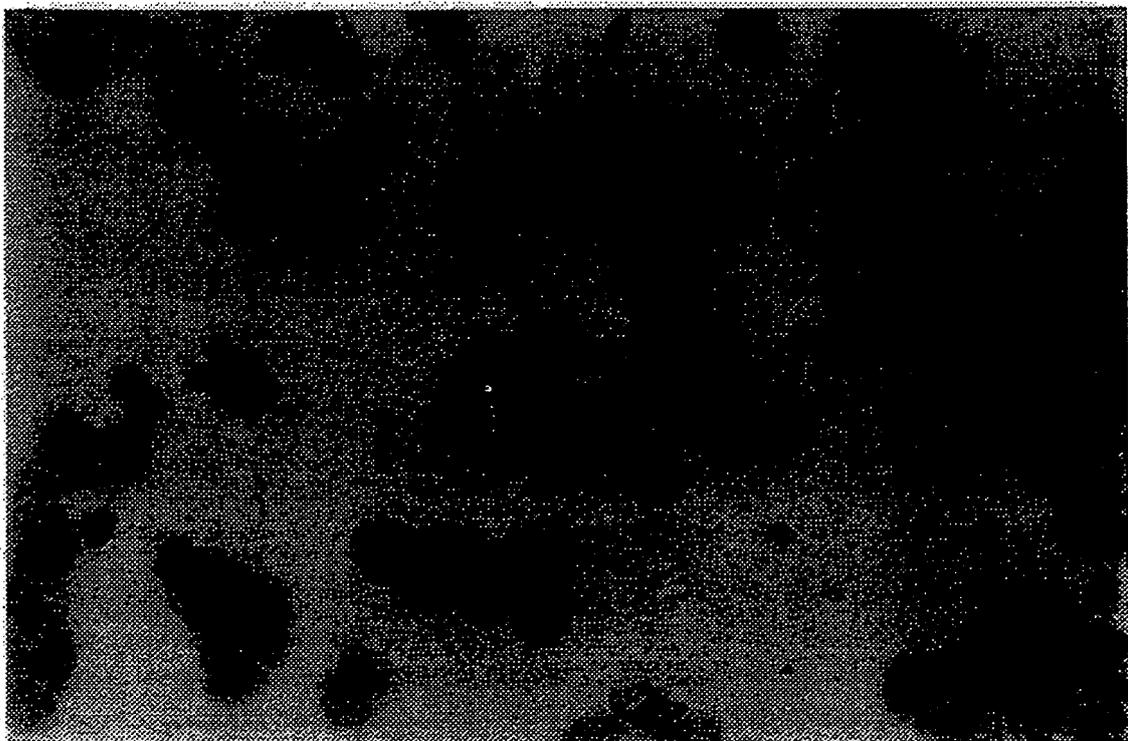


Fig. 6b

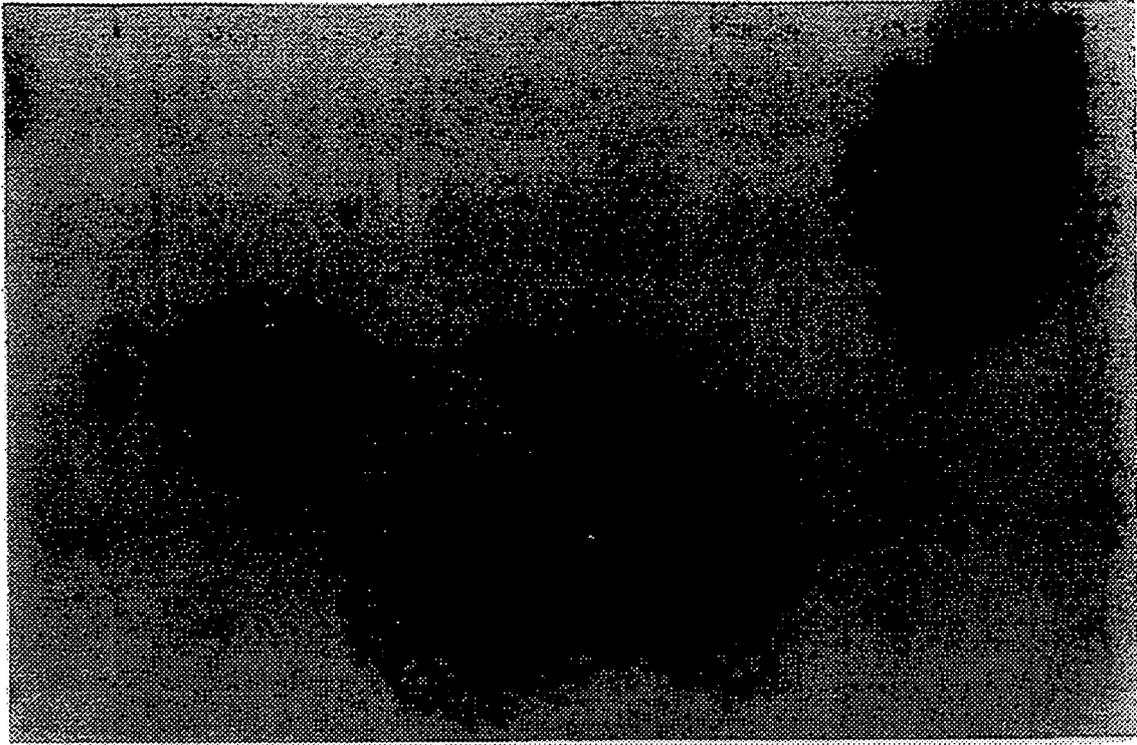


Fig. 6c

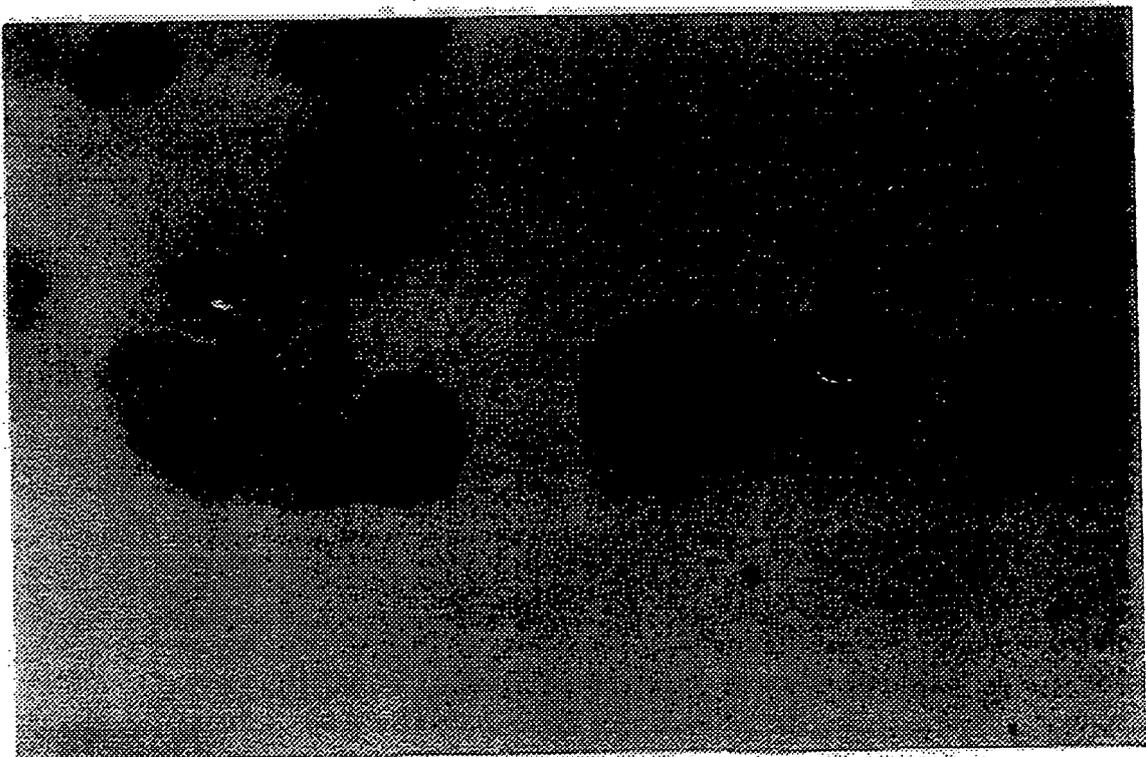


Fig. 6d

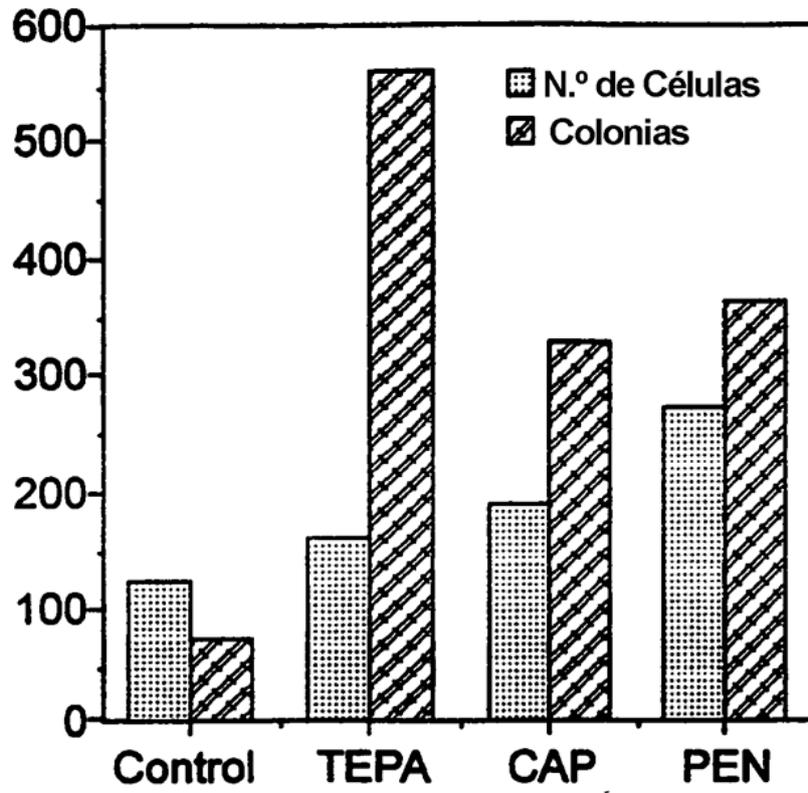


Fig. 7

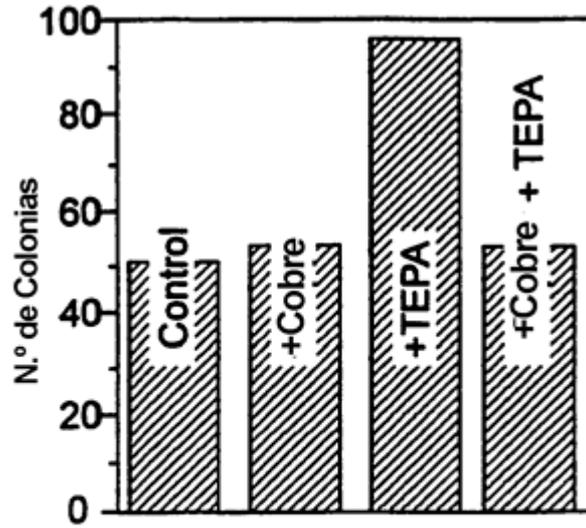


Fig. 8a

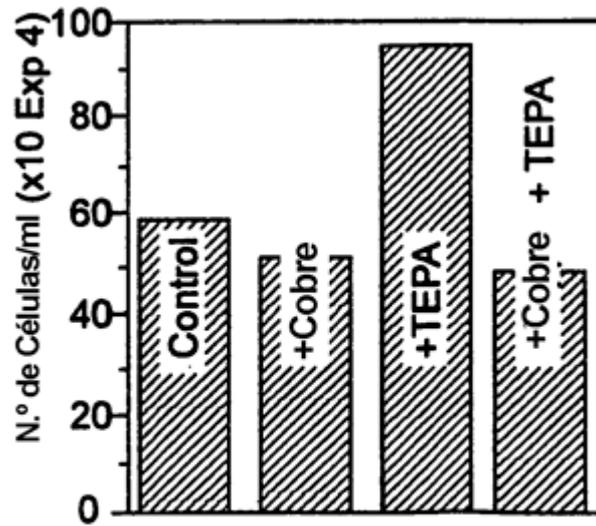


Fig. 8b

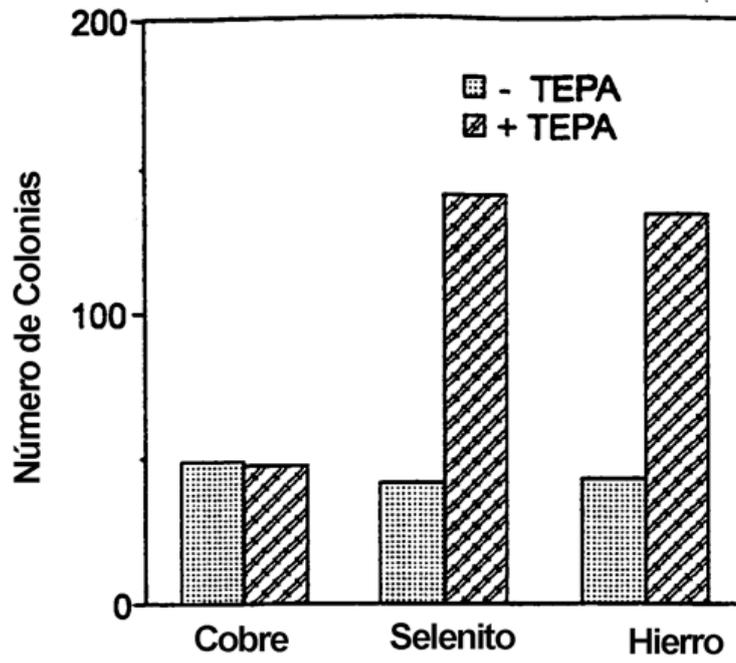


Fig. 9

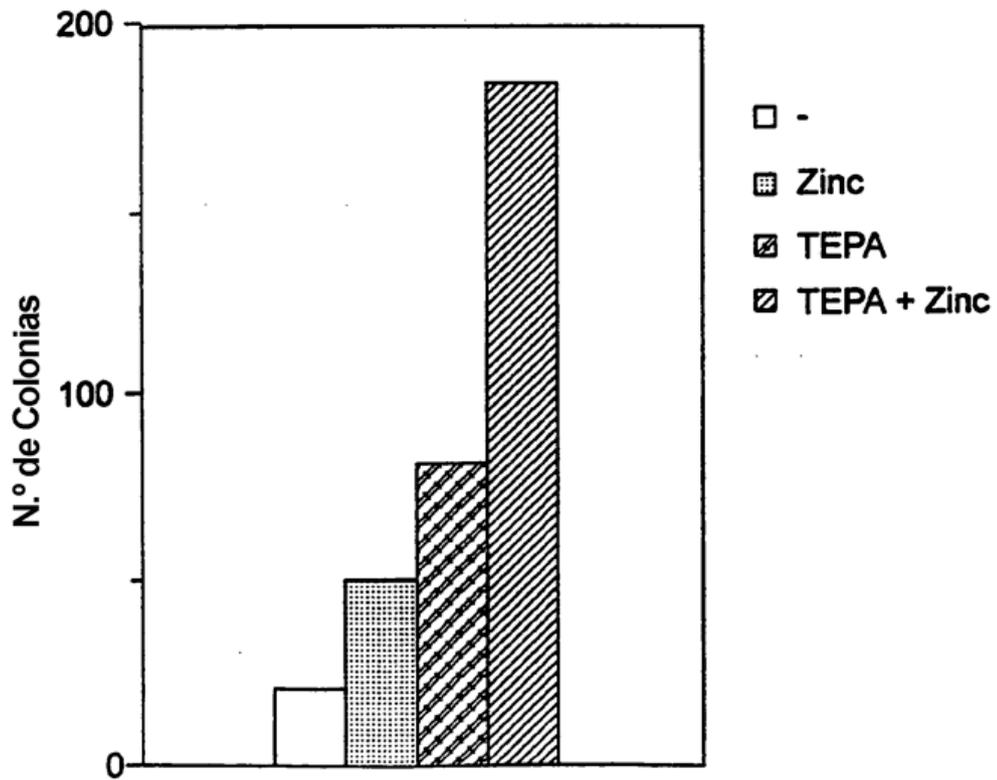


Fig. 10

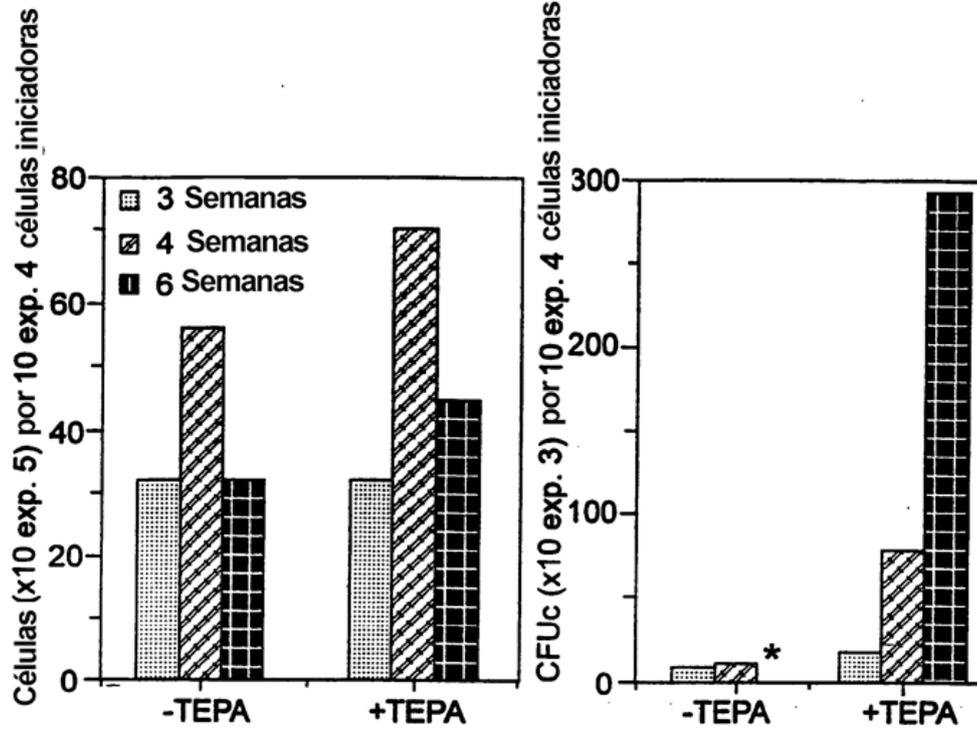


Fig. 11a

Fig. 11b

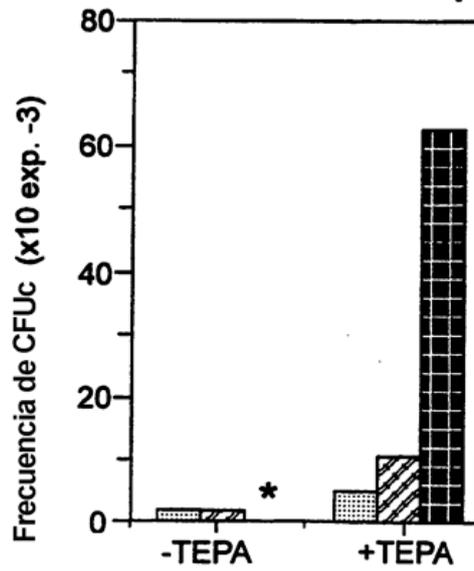


Fig. 11c

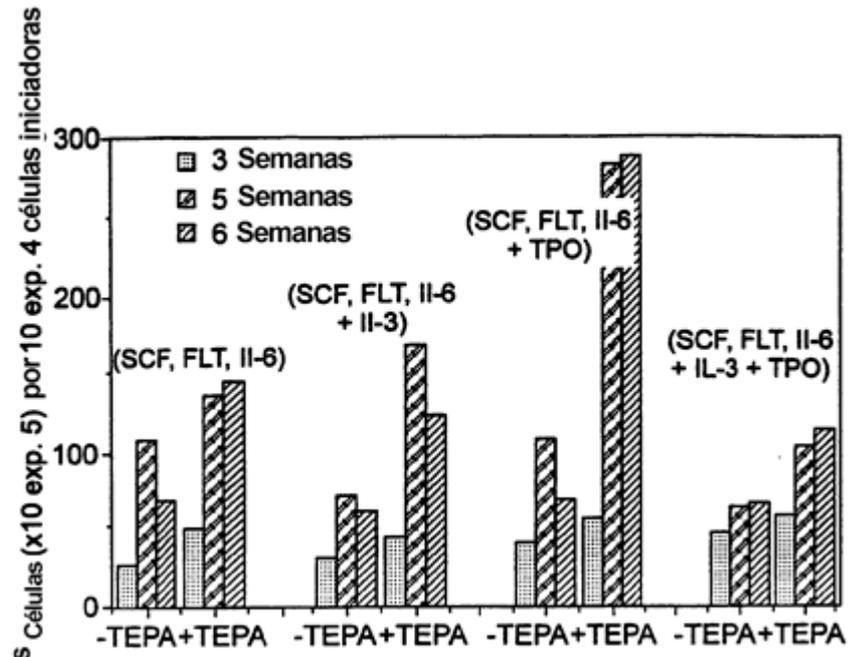


Fig. 12

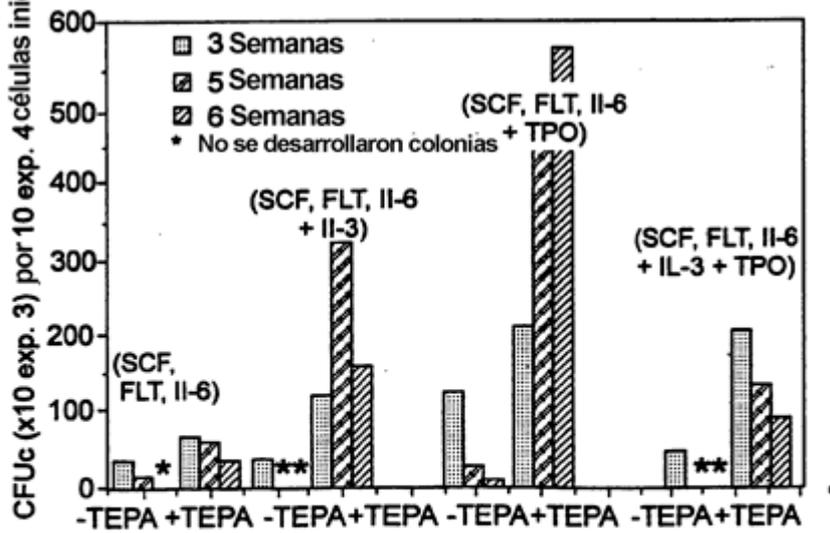


Fig. 13

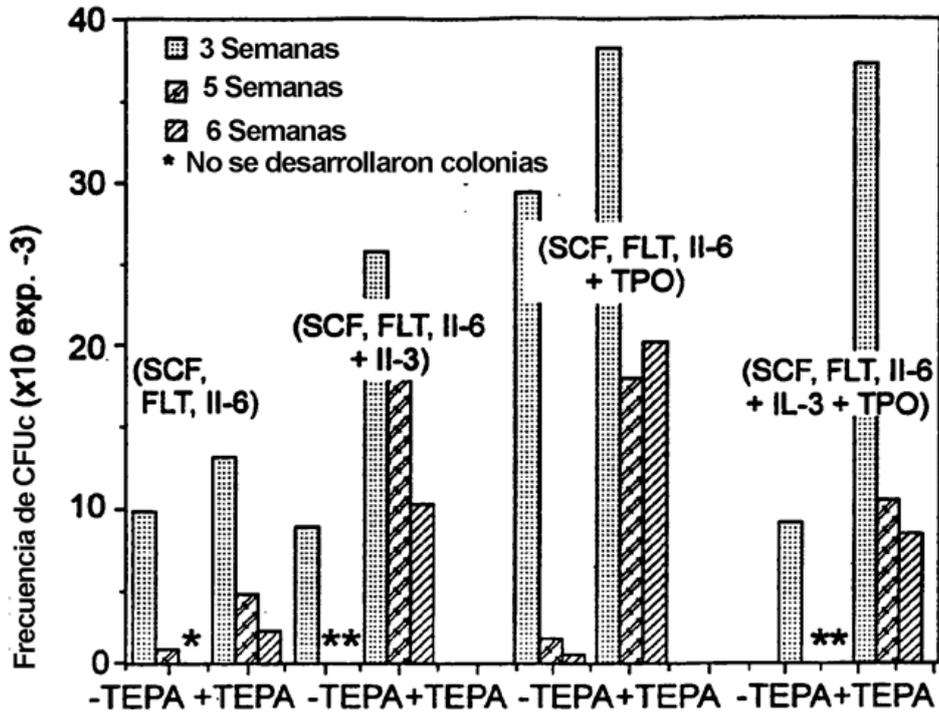


Fig. 14

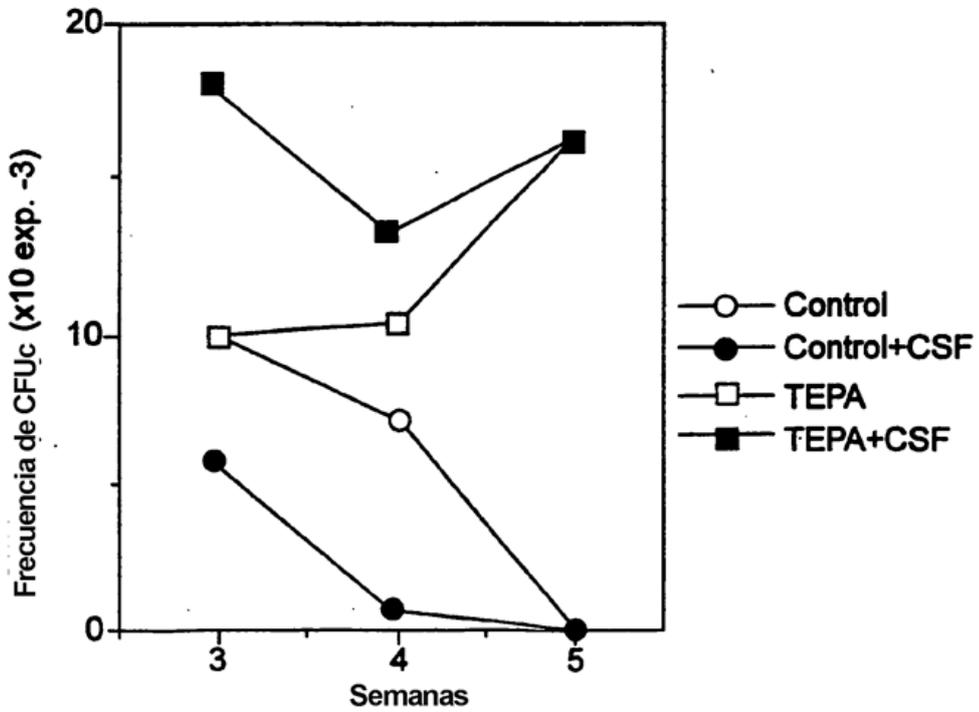


Fig. 15

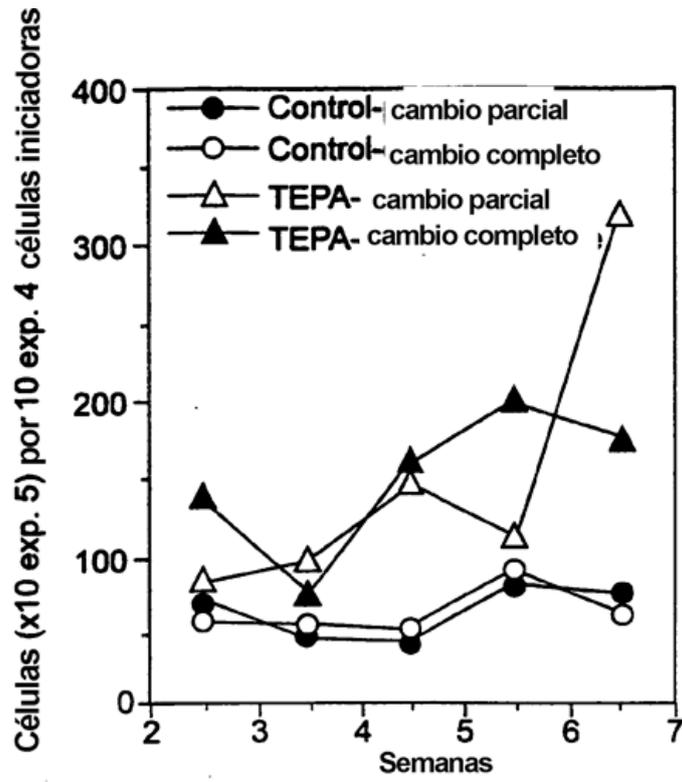


Fig. 16

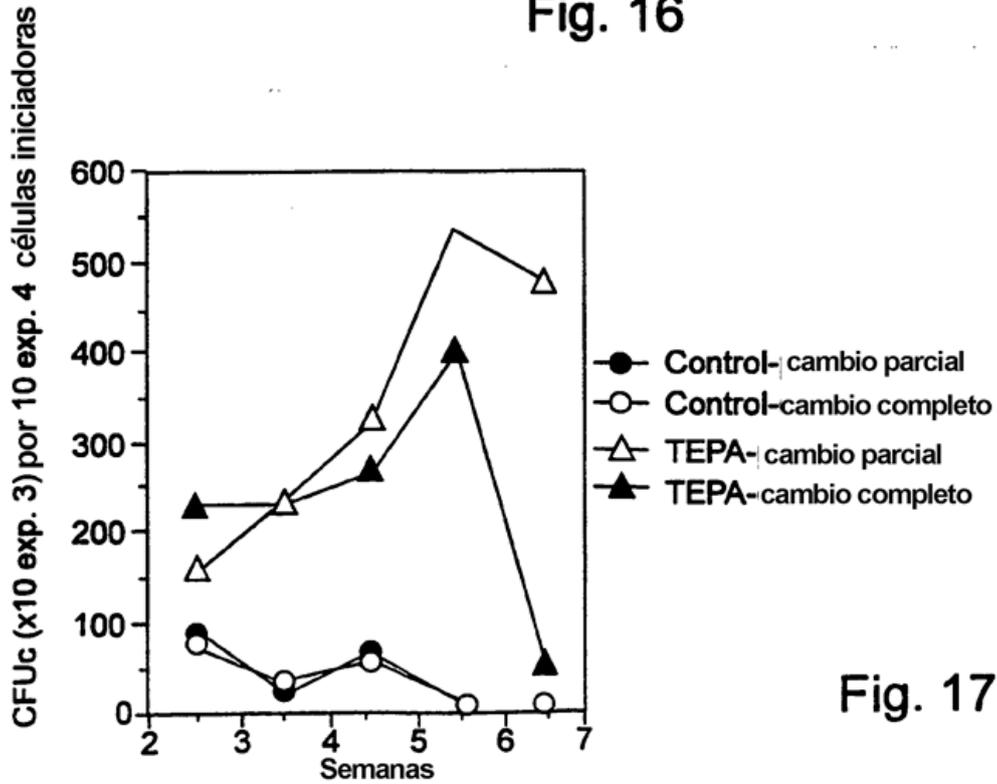


Fig. 17

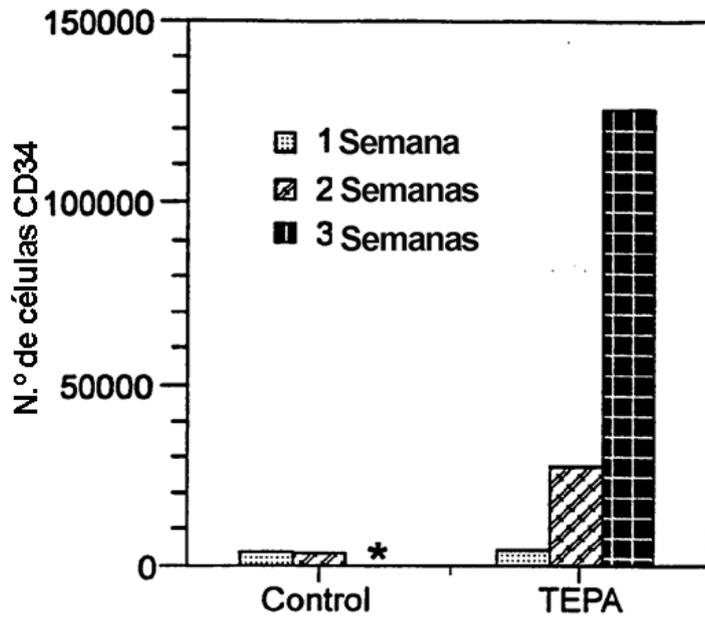


Fig. 18

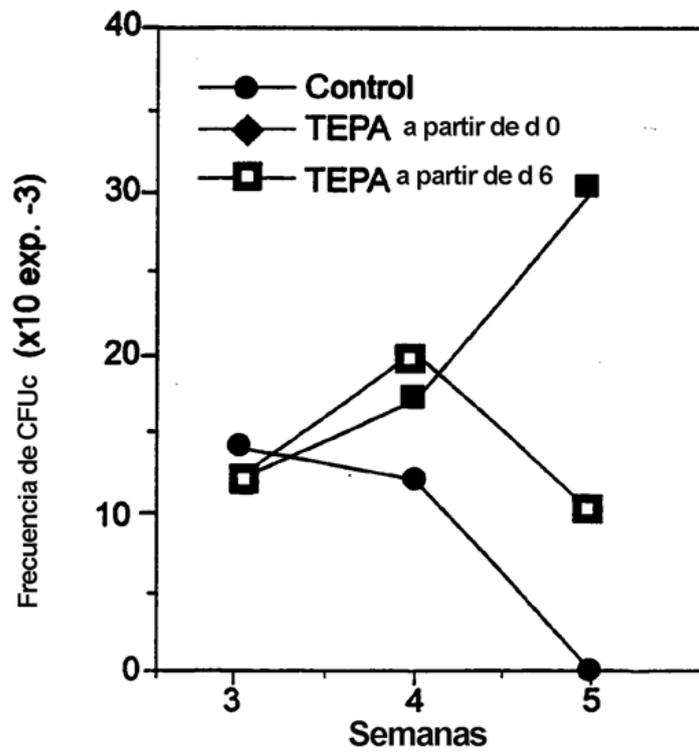


Fig. 19

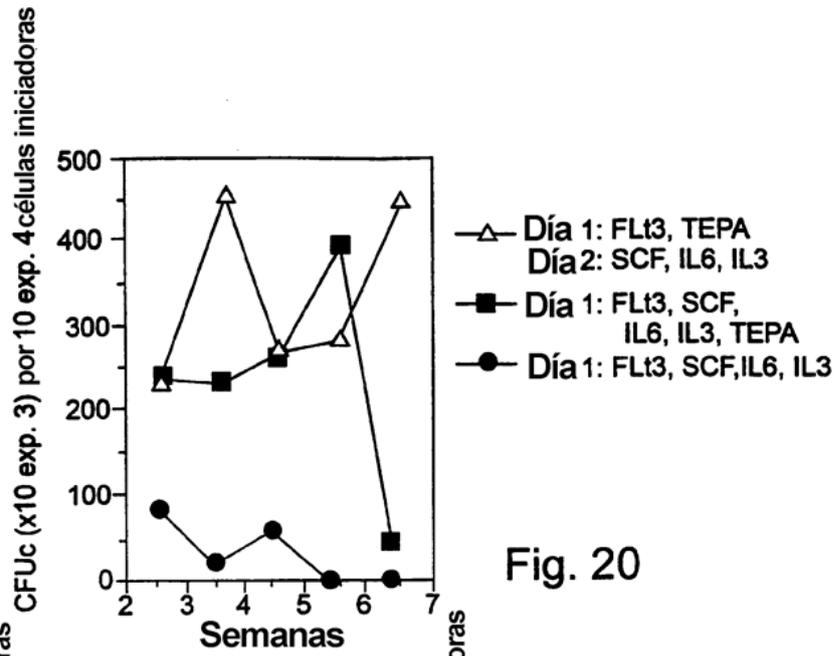


Fig. 20

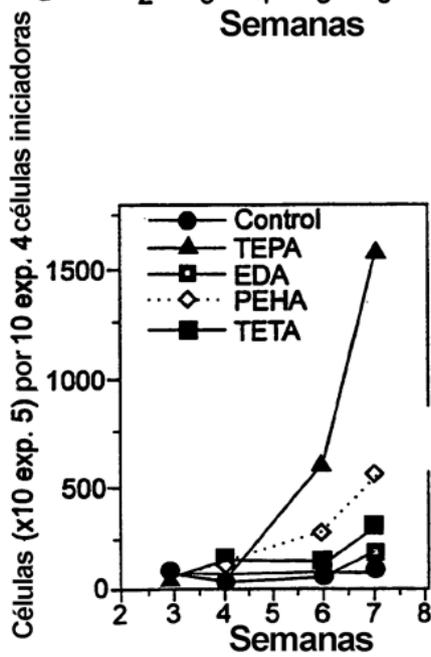


Fig. 21a

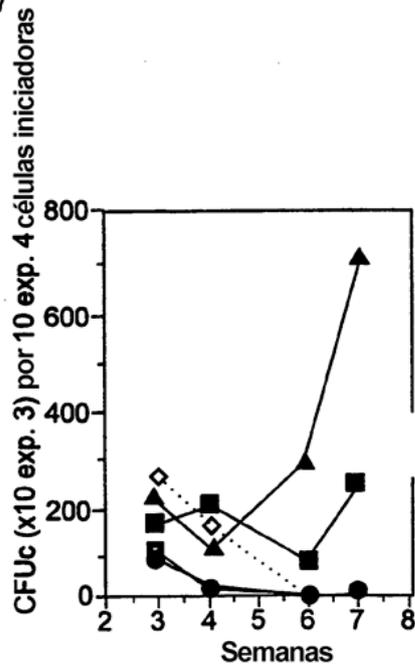


Fig. 21b

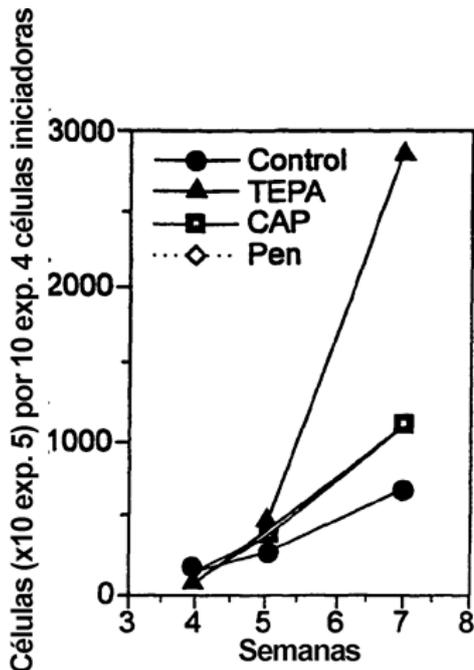


Fig. 22a

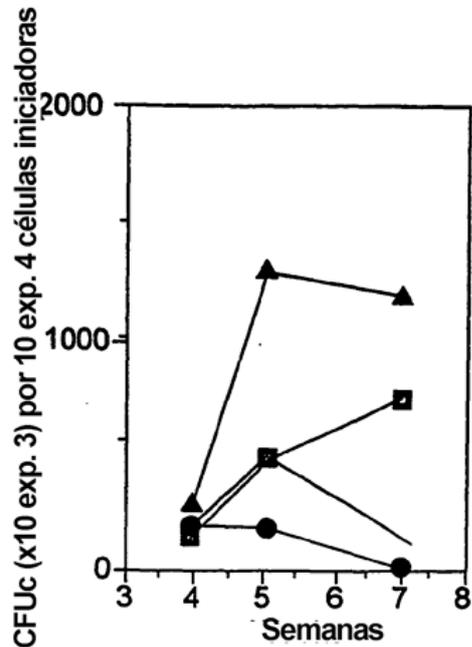


Fig. 22b

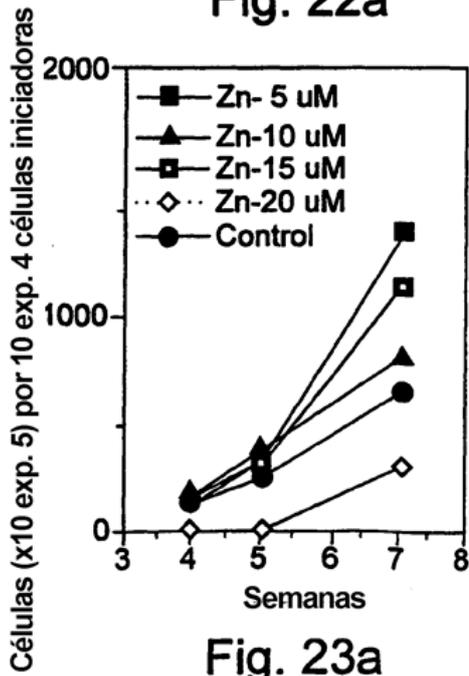


Fig. 23a

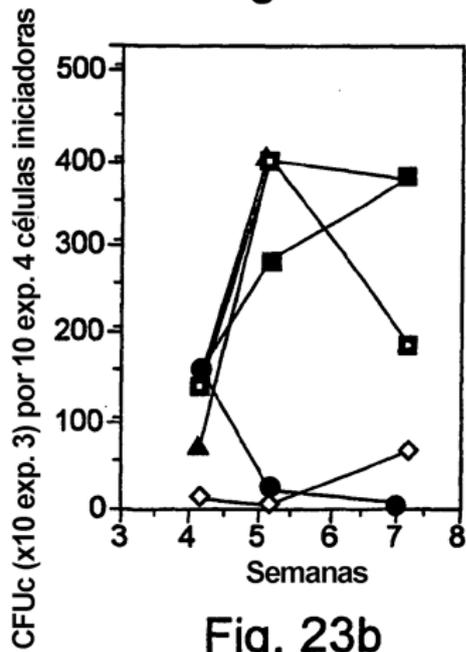


Fig. 23b

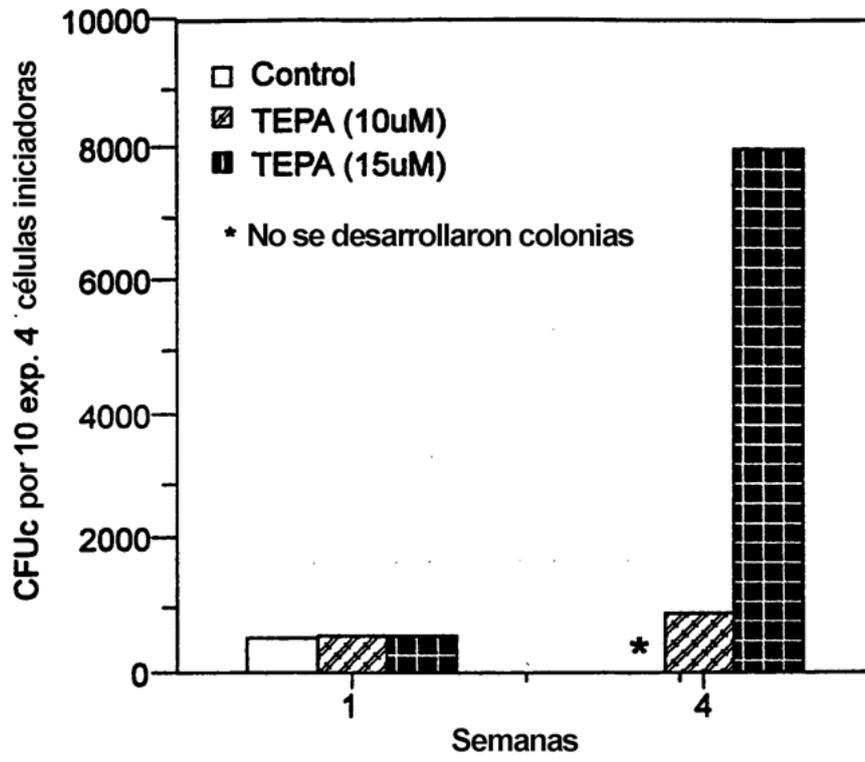


Fig. 24