

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 183**

51 Int. Cl.:
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02750673 .2**
96 Fecha de presentación: **15.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1432991**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Identificación y aislamiento de citoblastos somáticos y usos de los mismos**

30 Prioridad:
15.08.2001 AU PR703601

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

73 Titular/es:
Mesoblast, Inc.
275 Madison Avenue 4th Floor
New York NY 10016, US

72 Inventor/es:
SIMMONS, Paul, John

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 381 183 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

Identificación y aislamiento de citoblastos somáticos y usos de los mismos

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la identificación de una población específica de tipos de células, en particular a citoblastos somáticos que incluyen citoblastos hematopoyéticos, citoblastos mesenquimatosos y queratinocitoblastos. La invención también proporciona procedimientos de aislamiento y usos de los citoblastos derivados de los procedimientos.

10 INTRODUCCIÓN

[0002] Existe un gran interés en identificar tipos de células específicas en un esfuerzo por obtener poblaciones enriquecidas de las células. El tener posesión de una población enriquecida puede permitir un entendimiento de los tipos específicos de células o incluso proporcionar usos en diversas situaciones que incluyen trasplante, terapia
15 génica, tratamiento de enfermedad que incluye cánceres tales como leucemias, cánceres neoplásicos que incluyen cánceres de mama, o reparación de tejidos y piel.

[0003] Los citoblastos y el aislamiento e identificación de tales células proporcionan muchas ventajas. Estas células se definen como células que no están terminalmente diferenciadas, que pueden dividirse sin límite y que se
20 dividen para dar células que son tanto citoblastos como que se diferencian irreversiblemente para dar un nuevo tipo de célula. Aquellos citoblastos que dan lugar a un único tipo de célula se llaman células unipotentes; aquellas que dan lugar a muchos tipos de células se llaman células pluripotentes.

[0004] Los citoblastos están por definición presentes en todos los tejidos de autorrenovación. Se cree que
25 estas células tienen larga vida, tienen una gran posibilidad de división celular y por último lugar son responsables de la homeostasia de tejidos en estado estacionario. Los citoblastos poseen muchas de las siguientes propiedades: están relativamente sin diferenciar, ultraestructuralmente y bioquímicamente; tienen un gran potencial proliferativo y son responsables del mantenimiento y la regeneración a largo plazo de tejido; son normalmente de "ciclado lento", supuestamente para conservar su potencial proliferativo y para minimizar los errores de ADN que podrían producirse
30 durante la replicación; pueden estimularse para proliferar en respuesta a herida y a ciertos estímulos de crecimiento; están frecuentemente localizados en estrecha proximidad a una población de células rápidamente proliferantes correspondientes a las células de amplificación transitoria ("TA") en el esquema de (1) citoblasto a (2) célula TA a (3) célula terminalmente diferenciada; y se encuentran normalmente en áreas bien protegidas, altamente vascularizadas e innervadas.

35 **[0005]** Ha sido difícil la identificación positiva de citoblastos debido a que no hay marcadores inmunológicos o bioquímicos conocidos específicos para citoblastos somáticos. Como normalmente son de "ciclo lento", los procedimientos de identificación están limitados.

40 **[0006]** Los citoblastos son dianas importantes para terapia génica, en la que los genes insertados promueven la salud del individuo al que se trasplantan los citoblastos. Además, la capacidad para aislar los citoblastos puede servir en el tratamiento de linfomas y leucemias, además de otras afecciones neoplásicas en las que los citoblastos se purifican a partir de células tumorales en la médula ósea o sangre periférica, y se reinfunden en un paciente después de quimioterapia mielosupresora o mieloablative. Por tanto, mundialmente se han hecho esfuerzos hacia el
45 aislamiento de citoblastos en forma sustancialmente pura.

[0007] Los citoblastos constituyen sólo un pequeño porcentaje del número total de células pluripotentes. Las células pluripotentes son identificables por la presencia de una variedad de "marcadores" de la superficie celular. Tales marcadores pueden ser tanto específicos para un linaje o célula progenitora particular como estar presentes
50 en más de un tipo de célula. Actualmente no se sabe cuántos de los marcadores asociados a células diferenciadas también están presentes en citoblastos.

[0008] En vista de la pequeña proporción del número total de células en la médula ósea o sangre periférica que son citoblastos, ha sido difícil la incertidumbre de los marcadores asociados al citoblasto a diferencia de células
55 más diferenciadas, y la dificultad general en ensayar citoblastos biológicamente, la identificación y purificación de citoblastos.

[0009] Los citoblastos somáticos dan lugar a células que contribuyen en último lugar a diversas partes de la planta o animal. Generalmente, las células somáticas pueden dividirse en citoblastos hematopoyéticos,
60 mesenquimatosos o queratinocitoblastos.

[0010] Las células hematopoyéticas de mamífero son responsables de una gama extraordinariamente diversa de actividades. Se dividen en varios linajes, que incluyen linfóide, mieloide y eritroide. El linaje linfóide, que

comprende linfocitos B y linfocitos T, produce anticuerpos, regula la inmunidad celular y detecta agentes extraños tales como organismos causantes de enfermedad en la sangre. El linaje mielóide, que incluye monocitos, granulocitos y megacariocitos, monitoriza la sangre para cuerpos extraños, protege contra células neoplásicas, secuestra materiales extraños y produce plaquetas. El linaje eritroide incluye glóbulos rojos, que llevan oxígeno.

5

[0011] La escasez relativa de citoblastos hematopoyéticos ha impedido la extensa investigación sobre citoblastos y diferenciación hematopoyética en general. La disponibilidad inmediata de una población de células enriquecida en citoblastos hematopoyéticos haría posible la identificación de modificadores biológicos que afectan el comportamiento de los citoblastos. Por ejemplo, aún puede haber factores de crecimiento sin descubrir asociados a

10 (1) etapas tempranas de dedicación del citoblasto a un linaje particular; (2) la prevención de tal dedicación; y (3) la capacidad para controlar la proliferación de citoblastos.

[0012] La disponibilidad de números suficientes de citoblastos en una población enriquecida también sería extremadamente útil, por ejemplo, en reconstituir hematopoyesis en pacientes que están sometidos a

15 tratamientos que destruyen citoblastos, tales como quimioterapia contra el cáncer.

[0013] Los citoblastos mesenquimatosos (CM) son las células pluripotentes formativas encontradas, entre otros, en médula ósea, sangre, dermis y periostio que pueden diferenciarse en más de un tipo específico de tejidos mesenquimatosos o conjuntivos (es decir, los tejidos del cuerpo que soportan los elementos especializados; por

20 ejemplo, tejidos conjuntivos adiposos, óseos, de estroma, cartilaginosos, elásticos y fibrosos) que dependen de diversas influencias de factores bioactivos tales como citocinas. Los citoblastos mesenquimatosos (CMh) son reactivos con ciertos anticuerpos monoclonales, conocidos como SH2, SH3 y SH4.

[0014] Los queratinocitoblastos dan lugar a células de la piel y células de la epidermis. Son particularmente

25 útiles en el tratamiento de úlceras, heridas agudas e injerto de heridas agudas.

[0015] Sin embargo, la identificación de estos tipos de células específicas por marcadores de la superficie celular ha demostrado ser generalmente el mejor medio de identificación. La identificación de antígenos de superficie celular adicionales sería claramente de gran valor en la identificación, aislamiento y posterior

30 caracterización de citoblastos candidatos.

[0016] Por consiguiente, un objeto de la presente invención es vencer o aliviar algunos de los problemas de la técnica anterior.

35 RESUMEN DE LA INVENCION

[0017] En un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de identificación de un citoblasto como se explica en la reivindicación 1.

40 **[0018]** Se ha encontrado que las secuencias de péptidos descritas en este documento como SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 se expresan específicamente en citoblastos. La secuencia puede ser una parte de una proteína mayor o ser una secuencia expresada por los citoblastos. Estas secuencias pueden usarse solas o en combinación para identificar o aislar citoblastos.

45 **[0019]** Los solicitantes han encontrado que la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se expresa en citoblastos. La ACE actúa convirtiendo la angiotensina-I en angiotensina-II. La angiotensina-II aumenta la tensión arterial y se considera una causa principal de hipertensión esencial. Las secuencias descritas pueden ser una parte de ACE.

50 **[0020]** Puede usarse cualquier medio de identificación de ACE.

[0021] Preferentemente, el anticuerpo es cualquier anticuerpo específico para ACE. El anticuerpo usado en la presente invención engloba cualquier anticuerpo o fragmento del mismo, tanto nativo como recombinante, sintético o derivado naturalmente, monoclonal o policlonal, que retiene suficiente especificidad para unirse específicamente a la

55 ACE o a un fragmento de la misma que es indicativo de ACE. Preferentemente, el anticuerpo es anticuerpo BB9 ACE.

[0022] La presente invención también engloba un procedimiento para obtener una población de células enriquecida en citoblastos como se explica en la reivindicación 8.

60

[0023] Los procedimientos descritos en este documento también pueden usarse para aislar citoblastos de poblaciones de células o medir el contenido de citoblastos en tales poblaciones.

[0024] Una vez se aísla o identifica un citoblasto, pueden usarse en procedimientos para tratar o diagnosticar afecciones relacionadas con citoblastos.

[0025] Preferentemente, el citoblasto aislado es un citoblasto hematopoyético, citoblasto mesenquimatoso o un queratinocitoblasto. Sin embargo, también pueden incluirse otras células que incluyen células neuronales, hepáticas y pancreáticas. Más preferentemente, el citoblasto es un citoblasto hematopoyético.

[0026] Una vez se aísla la población de citoblastos, pueden emplearse técnicas de aislamiento adicionales para aislar subpoblaciones con los citoblastos. Pueden usarse marcadores específicos para células mesenquimatosas o queratinocitos para identificar y aislar los diversos linajes celulares.

FIGURAS

[0027]

La Figura 1 muestra la expresión de CD34 y BB9 sobre médula ósea humana normal. El panel A muestra la expresión de BB9 con respecto a la dispersión de la luz perpendicular (dispersión lateral) sobre CMNMO. La región rectangular rodea las células que son BB9⁺ y presentan baja dispersión lateral. El panel B muestra la expresión de CD34 y BB9. Las regiones rectangulares que definen células CD34⁺BB9⁺ (cuadrante derecho superior) y CD34⁺BB9⁻ (cuadrante derecho inferior) fueron típicas de las usadas para el aislamiento de células por FACS usada para ensayos clonogénicos y UFC precursoras.

La Figura 2 muestra que BB9 se une preferencialmente a progenitores hematopoyéticos primitivos. Los análisis de citometría de flujo de tres colores de la retención de Rh123 (panel A), expresión de CD38 (panel B) y CD90 (Thy-1: panel C) con respecto a la unión de BB9 sobre células CD34⁺ derivadas de MO. Los mayores niveles de expresión del antígeno de BB9 están presentes sobre CMNMO CD34⁺, que co-expresan CD90, muestran expresión de CD38 de baja a indetectable y son Rh123^{dim}. Cada representación se generó a partir de al menos 10⁴ acontecimientos de CD34⁺ recogidos como datos a modo de lista.

La Figura 3 muestra que BB9 identifica células quiescentes (G₀) en la población de CD34⁺ en MO humana adulta. El análisis de citometría de flujo de tres colores de la expresión de Ki67, CD34 y BB9 se realizó en MO adulta. El panel A representa la expresión de Ki67 y CD34 de CMNMO. La región 1 (R1) identifica células CD34⁺ que presentan expresión de Ki67 baja/negativa, mientras que R2 identifica células CD34⁺ con Ki67 alta. El panel B muestra la expresión de BB9 por aquellas células definidas por R1 (Ki67 baja: células quiescentes) y el panel C muestra la expresión de BB9 de células proliferantes (positivas) para Ki67.

La Figura 4 muestra UFC-GM y la generación de células nucleadas a partir de células de MO CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ en cultivo de UFC precursoras. La generación de UFC-GM (panel A) y las células nucleadas (panel B) y de 1000 células de MO CD34⁺BB9⁺ o CD34⁺BB9⁻ en cultivo de UFC precursoras se estimuló con 4 HGF (IL-3, IL-6, FC y G-FC). En el día 14 y a intervalos semanales después, los cultivos se sometieron a fraccionamientos 1 en 10 y se volvieron a alimentar con medio fresco y HGF. Se presentan la media y el error estándar de 10 experimentos separados con diferentes fuentes de MO.

La Figura 5 muestra una expresión de CD34 y BB9 en estado estacionario y glóbulos sanguíneos periféricos movilizados. Células mononucleares de sangre periférica de donantes voluntarios adultos normales, que representan hematopoyesis en estado estacionario (paneles A y B), y pacientes movilizados con ciclofosfamida a dosis alta (HDC) + FSC-G (panel C) o HDC + FSC-GM (panel D) se inmunomarcaron con anticuerpos para CD34 y BB9. Cada panel muestra la expresión de CD34 (eje horizontal) y BB9 (eje vertical) y los números dentro de cada cuadrante representan la proporción de células dentro del cuadrante respectivo. La representación de puntos mostrada dentro del panel B muestra la expresión de CD34 y BB9 para células CD34⁺ de sangre en estado estacionario. Estos datos son representativos de al menos 4 muestras de las diferentes fuentes de células.

La Figura 6 muestra UFC-GM y la generación de células nucleadas a partir de células CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ de SP movilizadas en cultivo de UFC precursoras. Los paneles A y B muestran la generación de UFC-GM y células nucleadas, respectivamente, a partir de 1000 linfocitos de SPM CD34⁺BB9⁺ o CD34⁺BB9⁻ en cultivo de UFC precursoras estimulado con 4 HGF (IL-3, IL-6, FC y G-FC). En el día 14 y a intervalos semanales después, los cultivos se sometieron a fraccionamientos 1 en 10 y se volvieron a alimentar con medio fresco y HGF. En cada momento de tiempo se presentan la media y el error estándar para los datos combinados de 6 pacientes, 3 movilizados con HDC + FSC-GM y 3 con HDC + FSC-G.

La Figura 7 muestra que BB9 identifica una proteína de 160 kDa. Análisis de inmunoprecipitación de células UT7 de superficie marcadas con ¹²⁵I. Carril 1, anticuerpo negativo de control. Carril 2, BB9; BB9 inmunoprecipitó una proteína de 160 kDa. Las posiciones de marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda.

La Figura 8 muestra células CD34⁺BB9⁺ que injertan funcionantemente ratones NOD/SCID.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

[0028] En un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de identificación de un citoblasto como se explica en la reivindicación 1.

[0029] Se ha encontrado que las secuencias de péptidos descritas en este documento como SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 se expresan específicamente en citoblastos. La secuencia puede ser una parte de una proteína mayor o ser una secuencia expresada por los citoblastos.

[0030] El término "equivalente" del mismo como se usa en este documento significa una secuencia que funciona de un modo similar, pero que puede tener deleciones, adiciones o sustituciones que no cambian sustancialmente la actividad o función de la secuencia. Por tanto, al menos un aminoácido puede deleccionarse, añadirse o sustituirse en la secuencia de péptidos sin cambiar sustancialmente la funcionalidad de la secuencia. Por tanto, la secuencia de péptidos con cambios todavía debe ser detectable para la identificación de los citoblastos.

[0031] Los solicitantes han encontrado que la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se expresa en citoblastos. La ACE actúa convirtiendo la angiotensina-I en angiotensina-II. La angiotensina-II aumenta la tensión arterial y se considera una causa principal de hipertensión esencial.

[0032] La ACE, también denominada en lo sucesivo peptidildipeptidasa A (EC 3.4.15.1) y quinasa II, es una metalopeptidasa, más particularmente una peptidasa de cinc que hidroliza la angiotensina I y otros polipéptidos biológicamente activos tales como quininas, por ejemplo, bradiquinina. La bradiquinina es un vasodilatador que actúa al menos en parte induciendo la liberación de prostaglandinas vasodilatadoras, y que se inactiva tras la hidrólisis por ACE. Por tanto, la ACE aumenta la tensión arterial al menos en parte produciendo angiotensina II, un vasoconstrictor, e inactivando bradiquinina, un vasodilatador. La bradiquinina también participa en otras actividades biológicas que incluyen mediación de dolor y reacciones inflamatorias.

30

[0033] Sin embargo, la enzima no se ha conectado previamente a citoblastos ni para su identificación.

[0034] La ACE o un fragmento de ACE puede detectarse en el citoblasto. Preferentemente, la molécula de ACE se detecta. Sin embargo, los fragmentos de la molécula de ACE también pueden ser indicativos de ACE. Tales fragmentos pueden incluir secuencias de péptidos que tienen la secuencia codificada por SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o un equivalente de la misma.

35

[0035] Los solicitantes han encontrado que SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2 se encuentran dentro de la secuencia de aminoácidos de ACE y se encontró posteriormente que se identificaban por anticuerpos para ACE.

40

[0036] En toda la descripción y reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden" y variaciones de la palabra tales como "que comprende" y "comprende" no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

[0037] Los citoblastos descritos en este documento incluyen todos los citoblastos que son células esencialmente no diferenciadas en un embrión o adulto que pueden experimentar división ilimitada y pueden dar lugar a uno o varios tipos de células. Los citoblastos de la presente invención son citoblastos somáticos seleccionados del grupo que incluye citoblastos hematopoyéticos, citoblastos mesenquimatosos, queratinocitoblastos neuronales, células hepáticas y pancreáticas. Más preferentemente, son citoblastos hematopoyéticos que pueden diferenciarse a citoblastos de un linaje linfoide, mieloide o eritroide.

50

[0038] La muestra de citoblastos puede originarse a partir de cualquier fuente que incluye una fuente adulta. Preferentemente, la fuente de citoblastos es de la médula ósea que incluye crestas ilíacas, tibia, fémures, columna vertebral, periostio, endostio u otras cavidades óseas, sangre, hígado fetal, bazo, periférico, sangre, piel, dermis, hígado, cerebro, páncreas o riñón.

55

[0039] La muestra puede ser una muestra de tejido o una suspensión de células o células derivadas de cualquier fuente cultivadas *in vitro* que permita la interacción de un marcador para ACE para identificar los citoblastos.

60

[0040] Para el aislamiento de médula ósea puede usarse una disolución apropiada para lavar el hueso que incluye, pero no se limita a, solución salina, convenientemente complementada con suero bovino fetal (SBF) u otros factores que se producen naturalmente, conjuntamente con un tampón aceptable a baja concentración,

generalmente de aproximadamente 5-25 mM. Tampones convenientes incluyen, pero no se limitan a, HEPES, tampones fosfato y tampones lactato. De otro modo, la médula ósea puede aspirarse del hueso según técnicas convencionales.

5 **[0041]** El procedimiento de detectar ACE o las secuencias específicas SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 dependerá del tipo de muestra que incluye los citoblastos. Generalmente, la muestra se expone o se combina con un marcador para ACE o las secuencias de un modo que se facilite la interacción del marcador con las células. Por ejemplo, si la muestra es una suspensión de células como en una muestra de sangre, el marcador puede simplemente añadirse a la suspensión de células. Esto es aplicable si el marcador pretende identificar físicamente
10 ACE o las secuencias.

[0042] El marcador para ACE o las secuencias puede incluir cualquier medio que identifique ACE o las secuencias, preferentemente es un marcador que identifica ACE o las secuencias sobre una superficie celular que incluye, pero no se limita a, anticuerpos para ACE o las secuencias, agonistas y antagonistas contra ACE o las
15 secuencias, sistemas de detección de ácido nucleico que pueden detectar la expresión de ACE o las secuencias tanto por la presencia de proteína de ADN, ARN, ARNm como de ACE, y ensayos enzimáticos, de fluorescencia o colorimétricos para ACE. El procedimiento de detección será evidente para el destinatario experto para el tipo de marcador seleccionado.

20 **[0043]** El marcador puede incluir la adición de marcas para potenciar la identificación del marcador. Por ejemplo, los marcadores de fluorescencia, radiactividad o enzimáticos familiares para el destinatario experto pueden ligarse al marcador para potenciar la detección.

[0044] Preferentemente, el anticuerpo es cualquier anticuerpo específico para ACE. El anticuerpo usado en la
25 presente invención engloba cualquier anticuerpo o fragmento del mismo, tanto nativo como recombinante, sintético o derivado naturalmente, monoclonal o policlonal, que retiene suficiente especificidad para unirse específicamente a la ACE o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE. Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen el anticuerpo completo y fragmentos de anticuerpos que contienen porciones funcionales del mismo. El término "anticuerpo" incluye cualquier compuesto monoespecífico biespecífico que
30 comprende una porción suficiente de la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada para efectuar la unión al epítipo por el que el anticuerpo completo tiene especificidad de unión. Los fragmentos pueden incluir la región variable de al menos un polipéptido de inmunoglobulina de la cadena pesada o ligera, e incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fv.

35 **[0045]** El anticuerpo recombinante puede producirse por cualquier medio recombinante conocido en la técnica. Tales anticuerpos recombinantes incluyen, pero no se limitan a, fragmentos producidos en bacterias y anticuerpos no humanos en los que la mayoría de las regiones constantes han sido sustituidas por regiones constantes de anticuerpo humano. Además, tales anticuerpos "humanizados" pueden obtenerse por vertebrados huésped genéticamente manipulados para expresar el anticuerpo recombinante.
40

[0046] Además, los dominios monoespecíficos pueden unirse, mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, a otro compuesto de molécula adecuada. La unión puede ser, por ejemplo, química o por ingeniería genética.

45 **[0047]** Los anticuerpos pueden conjugarse con otras moléculas y compuestos adecuados que incluyen, pero no se limitan a, enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radiactivos o fármacos. Las enzimas que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, peroxidasa, ureasa y β-galactosidasa. Los fluorocromos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, la fluoresceína es tiocianato, isotiocianato de
50 tetrametilrodamina, ficoeritrina, aloficocianinas y rojo Texas. Para fluorocromos adicionales que pueden conjugarse con anticuerpos véase Haugland, R. P. Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992-1994). Los compuestos metálicos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, ferritina, oro coloidal y particularmente perlas superparamagnéticas coloidales. Los haptenos que pueden conjugarse con los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, biotina, digoxigenina, oxalona y nitrofenol. Los
55 compuestos radiactivos que pueden conjugarse o incorporarse en los anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tecnecio 99m, ¹²⁵I y aminoácidos que comprenden cualquier radionúclido, que incluyen, pero no se limitan a ¹⁴C, ³H y ³⁵S.

[0048] Los anticuerpos para ACE pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica para la
60 producción de anticuerpos o porciones funcionales de los mismos. Los procedimientos específicos usados se describen en los ejemplos presentados en este documento, aunque puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica de la producción de anticuerpos. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, separar linfocitos B con anticuerpos de superficie celular de la especificidad deseada, clonar el ADN que expresa las regiones

variables de las cadenas ligeras y pesadas y que expresa los genes recombinantes en una célula huésped adecuada. Pueden usarse técnicas de generación de anticuerpos monoclonales convencionales en las que los anticuerpos se obtienen a partir de células de hibridoma productoras de anticuerpos inmortalizados. Estos hibridomas pueden producirse inmunizando animales con citoblastos, y fusionando linfocitos B de los animales
5 inmunizados, preferentemente aislados del bazo huésped inmunizado, con células inmortalizadas compatibles, preferentemente un mieloma de linfocitos B.

[0049] Los anticuerpos para ACE pueden obtenerse de cualquier fuente. Pueden estar comercialmente disponibles. Eficazmente, cualquier medio que detecte la presencia de ACE sobre las células está en el alcance de
10 la presente invención.

[0050] Ramshaw y col., Experimental Haematology 29, 2001, 981-992, describen la identificación de un anticuerpo monoclonal (MAb), BB9, por los solicitantes basado en su unión a células del estroma, una subpoblación secundaria de células mononucleares en MO humana adulta y la correspondiente falta de reactividad con leucocitos
15 en SP. BB9 unido a una subpoblación secundaria de células de MO CD34⁺ caracterizada por la expresión del antígeno CD34 y Thy-1 de alto nivel, expresión de CD38 ausente baja, baja retención de rodamina 123 y estado de ciclo quiescente como se evidencia por la falta de marcado con Ki67. Las células CD34⁺BB9⁺, a diferencia de las células CD34⁺BB9⁻, demostraron una capacidad para sostener preferentemente la hematopoyesis en cultivo de UFC precursoras estimulado por la combinación de IL-3, IL-6, FSC-G y FC. BB9 también demostró unión a células CD34⁺
20 de SP movilizadas.

[0051] BB9 se identificó durante el cribado de anticuerpos inicial por su falta aparente de unión a células mononucleares en MO adulta y sangre periférica (SP) y, en el posterior análisis de citometría de flujo, por su unión a una subpoblación secundaria de células CD34⁺ de MO. Se ha mostrado que estas células sostienen la
25 hematopoyesis a largo plazo en cultivo líquido libre de células del estroma y por análisis fenotípicos para expresar marcadores característicos de células progenitoras hematopoyéticas primitivas.

[0052] El aislamiento de este anticuerpo se describe específicamente en este documento en los ejemplos.

[0053] BB9 se usa preferentemente para identificar citoblastos hematopoyéticos. Sin embargo, los solicitantes han encontrado que también es útil identificar citoblastos mesenquimatosos y queratinocitoblastos.
30

[0054] El procedimiento explicado brevemente en este documento es particularmente útil para identificar citoblastos de una población de células. Sin embargo, pueden usarse marcadores adicionales para distinguir
35 adicionalmente subpoblaciones dentro de la población de citoblastos general.

[0055] Por ejemplo, los citoblastos mesenquimatosos pueden identificarse adicionalmente por marcadores que incluyen, pero no se limitan a, STRO-1, SH2, SH3 y SH4. Estos marcadores pueden usarse individualmente o en combinación para identificar citoblastos mesenquimatosos.
40

[0056] Los queratinocitoblastos pueden identificarse por marcadores que incluyen, pero no se limitan a, citoqueratina 14, alfa-6 integrina (CD49F) y CD71. Estos marcadores pueden usarse por separado o en combinación para identificar queratinocitoblastos.

[0057] La etapa de uso de marcadores adicionales puede aplicarse por separado o en combinación con un marcador de ACE.
45

[0058] En otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para obtener una población de células enriquecida en citoblastos como se explica en la reivindicación 8.
50

[0059] Por tanto, la presente invención engloba procedimientos de enriquecimiento de una población en citoblastos. Los procedimientos implican combinar una mezcla de citoblastos preferentemente con un anticuerpo que reconoce y se une a ACE en condiciones que permitan que el anticuerpo se una a ACE y separar las células reconocidas por el anticuerpo para obtener una población sustancialmente enriquecida en citoblastos. Sin embargo,
55 pueden usarse otras formas de identificación de ACE como se ha descrito anteriormente. Los procedimientos pueden usarse como un ensayo de diagnóstico para el número de citoblastos en una muestra. Las células y anticuerpo se combinan en condiciones suficientes para permitir la unión específica del anticuerpo para ACE y los citoblastos que luego se cuantifican. Los citoblastos pueden aislarse o purificarse adicionalmente.

[0060] Como se ha mencionado anteriormente, la población de células puede obtenerse a partir de cualquier fuente de citoblastos que incluye aquellas muestras tratadas anteriormente.
60

[0061] La detección para la presencia de ACE puede realizarse de cualquier forma para identificar ACE sobre

células. Preferentemente, la detección es por uso de un marcador para ACE. El marcador para ACE puede ser cualquiera de los marcadores tratados anteriormente. Sin embargo, los anticuerpos para ACE son particularmente útiles como marcador para ACE. Más preferentemente, el anticuerpo es BB9.

5 **[0062]** Como se ha mencionado anteriormente, puede detectarse ACE o un fragmento de ACE. Preferentemente se detectará la molécula completa de ACE o puede detectarse un fragmento correspondiente a SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o equivalentes del mismo.

10 **[0063]** Pueden emplearse diversas técnicas para separar o enriquecer las células eliminando inicialmente células de linaje dedicado. Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles para identificar linajes celulares y/o estadios de diferenciación. Los anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido para permitir la separación bruta. Las técnicas de separación empleadas deben maximizar la retención de viabilidad de la fracción que va a recogerse. Pueden emplearse diversas técnicas de eficacia diferente para obtener separaciones "relativamente brutas". La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, citotoxicidad asociada, facilidad y velocidad
15 de rendimiento y necesidad de equipo sofisticado y/o habilidad técnica.

[0064] Los procedimientos para la separación o enriquecimiento pueden incluir, pero no se limitan a, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados conjuntamente con un anticuerpo monoclonal que incluyen,
20 pero no se limitan a, complemento y citotoxinas, e "inmunopurificación" con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa, elutriación o cualquier otra técnica conveniente.

[0065] El uso de técnicas de separación o enriquecimiento incluye, pero no se limita a, aquellas basadas en diferencias en propiedades físicas (centrifugación en gradiente de densidad y elutriación centrífuga en
25 contracorriente), de la superficie celular (afinidad por lectina y anticuerpo) y de tinción vital (colorante de unión a mitocondrias rho123 y colorante de unión a ADN, Hoechst 33342).

[0066] Las técnicas que proporcionan separación precisa incluyen, pero no se limitan a, FACS, que puede tener grados variables de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales de detección de la
30 dispersión de la luz de ángulo bajo y obtusa, canales de impedancia, etc.

[0067] En una primera separación, normalmente empezando con aproximadamente $1 \times 10^{8-9}$, preferentemente a aproximadamente $5 \times 10^{8-9}$ células, el anticuerpo para ACE puede marcarse con un fluorocromo, mientras que los anticuerpos para los diversos linajes dedicados pueden conjugarse con al menos un fluorocromo diferente. Aunque
35 cada uno de los linajes puede separarse en una etapa separada, deseablemente los linajes se separan al mismo tiempo que uno está seleccionando positivamente ACE y/u otros marcadores de citoblastos. Las células pueden seleccionarse contra células muertas empleando colorantes asociados a células muertas (que incluyen, pero no se limitan a, yoduro de propidio (PI)). Preferentemente, las células se recogen en un medio que comprende 2 % de SBF.
40

[0068] Aunque se cree que el orden particular de separación no es crítico para la presente invención, se prefiere el orden indicado. Preferentemente, las células se separan inicialmente por una separación gruesa, seguido de una separación fina, con selección positiva con anticuerpo para ACE.

45 **[0069]** Preferentemente, el anticuerpo es BB9. Sin embargo, otros anticuerpos para ACE serían igualmente eficaces. Puede utilizarse cualquier procedimiento de separación que emplee anticuerpos para aislar células y sea familiar para el destinatario experto.

[0070] Para enriquecer adicionalmente en cualquier población de células pueden usarse marcadores
50 específicos para aquellas poblaciones de células. Por ejemplo, marcadores específicos para células mesenquimatosas que incluyen, pero no se limitan a, STRO-1, SH2, SH3 y SH4 puede usarse para enriquecer en o contra estas células.

[0071] Similarmente, los marcadores específicos para queratinocitoblastos que incluyen, pero no se limitan a,
55 citoqueratina 14, alfa-6 integrina (CD49F) y CD71 pueden usarse para enriquecer en o contra aquellas células.

[0072] Estos marcadores también pueden usarse para enriquecer en citoblastos hematopoyéticos eliminando o seleccionando citoblastos mesenquimatosos o queratinocitoblastos.

60 **[0073]** En este documento se desvela un procedimiento de eliminación de citoblastos a partir de una población que comprende las etapas de

obtener una población de células que comprende citoblastos;

detectar la presencia de ACE o un fragmento de la misma o una célula; y seleccionar aquellas células que se identifican por la presencia de ACE sobre la célula.

5 **[0074]** Del mismo modo que el enriquecimiento, el uso de ACE puede invertirse para proporcionar una población sustancialmente carente de citoblastos. El procedimiento usado anteriormente para seleccionar aquellas células que expresan ACE puede usarse para seleccionar las mismas células que abandonan una población separada de los citoblastos.

10 **[0075]** Preferentemente, la ACE se detecta usando un anticuerpo para ACE o un fragmento del mismo. El fragmento puede estar codificado por SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2 o un equivalente de las mismas. Preferentemente, el anticuerpo es BB9.

15 **[0076]** Los procedimientos descritos anteriormente puede incluir adicionalmente etapas de enriquecimiento en células por selección positiva para otros marcadores específicos de citoblastos. Marcadores específicos de citoblastos positivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, CD34⁺, Thy-1⁺ y c-kit⁺. Preferentemente, los citoblastos son humanos, pero pueden derivarse de cualquier animal adecuado. Mediante la selección apropiada con factores particulares y el desarrollo de bioensayos que permiten la autorregeneración de citoblastos y el cribado de los citoblastos en cuanto a sus marcadores puede producirse una composición enriquecida para citoblastos viables para una variedad de fines.

20 **[0077]** En este documento se desvela un procedimiento de aislamiento de un citoblasto que comprende

obtener una población de células que comprende citoblastos;
detectar la presencia de ACE o un fragmento de la misma sobre una célula;
25 seleccionar aquellas células que se identifican por la presencia de ACE sobre la célula; y
aislar aquellas células identificadas por la presencia de ACE.

30 **[0078]** Los citoblastos pueden aislarse por cualquiera de los procedimientos usados para el enriquecimiento como se ha descrito anteriormente, siempre que esté la etapa añadida de aislar el citoblasto. Técnicas útiles incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados conjuntamente con un anticuerpo monoclonal que incluye, pero no se limita a, complemento y citotoxinas, e "inmunopurificación" con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa, elutriación o cualquier otra técnica conveniente. Los expertos en la materia serían familiares a estas técnicas y podrían emplear cualquier técnica conocida siempre que se seleccione ACE.

35 **[0079]** En este documento se desvela un procedimiento de aislamiento de un citoblasto que comprende

obtener una población de células que comprende citoblastos;
combinar la población de células con un anticuerpo para ACE;
40 seleccionar aquellas células que se identifican por el anticuerpo para ACE; y aislar aquellas células identificadas por el anticuerpo.

45 **[0080]** Preferentemente, el anticuerpo es BB9. Sin embargo, puede usarse cualquier anticuerpo presentemente disponible que sea específico para ACE.

[0081] Preferentemente, el citoblasto aislado es un citoblasto hematopoyético, citoblasto mesenquimatoso o un queratinocitoblasto. Sin embargo, también pueden incluirse otras células que incluyen células neuronales, hepáticas y pancreáticas. Más preferentemente, el citoblasto es un citoblasto hematopoyético.

50 **[0082]** Una vez se aísla la población de citoblastos pueden emplearse técnicas de aislamiento adicionales para aislar subpoblaciones con los citoblastos. Marcadores específicos descritos anteriormente para células mesenquimatosas o de queratinocitos pueden usarse para identificar y aislar los diversos linajes celulares.

[0083] En otro aspecto se proporciona un citoblasto aislado mediante los procedimientos descritos en este documento. Más preferentemente, el citoblasto es un citoblasto hematopoyético.

60 **[0084]** La presente invención también proporciona en otro aspecto una composición de citoblastos enriquecidos. Preferentemente, los citoblastos enriquecidos comprenden un enriquecimiento de citoblastos hematopoyéticos.

[0085] Si las composiciones están enriquecidas en citoblastos, éstos pueden usarse en injerto funcionante autólogo. Además, el uso de citoblastos autólogos evitará la enfermedad de injerto frente a huésped. Además, las células pueden modificarse por transferencia génica apropiada para corregir defectos genéticos o proporcionar

capacidades genéticas de las que se carece naturalmente en los citoblastos o su progenie, tanto en cuanto a los citoblastos individuales como en cuanto a los citoblastos en general. Además, la composición de citoblastos puede usarse para aislar y definir factores asociados a su regeneración y diferenciación.

5 **[0086]** En este documento se desvela un procedimiento de medición del contenido de citoblastos, comprendiendo dicho procedimiento:

obtener una población de células que comprende citoblastos;

detectar la presencia de ACE o un fragmento de la misma sobre una célula con un indicador de ACE;

10 seleccionar aquellas células que tienen ACE o un fragmento de la misma sobre la célula; y
cuantificar las células seleccionadas con respecto a la cantidad de células en la población de células antes de selección.

[0087] En este documento se desvela un procedimiento de medición del contenido de citoblastos,
15 comprendiendo dicho procedimiento

obtener una población de células que comprende citoblastos;

combinar la población de células con un anticuerpo para ACE;

seleccionar aquellas células que se identifican por el anticuerpo para ACE; y

20 cuantificar la cantidad de células seleccionadas con respecto a la cantidad de células en la población de células antes de la selección con anticuerpo para ACE.

[0088] Cuantificar la cantidad de citoblastos seleccionados proporciona un medio de diagnóstico de una
25 afección asociada a citoblastos tal como, pero no se limita a, leucemia, carcinomas o sarcomas o infecciones
generales que pueden producir un aumento en la actividad de citoblastos, particularmente en las poblaciones
hematopoyéticas de citoblastos, más específicamente en los linajes linfoides de aquellas poblaciones. En particular,
la cuantificación puede proporcionar una indicación de los linfocitos B y T que pueden diferenciarse de los linajes
linfoides para proporcionar la producción de anticuerpos, regulación del sistema inmunitario celular, detección de
agentes extraños en la sangre, detección de células extrañas al huésped y similares. El linaje mielóide, que incluye
30 monocitos, granulocitos, megacariocitos, además de otras células, monitoriza la presencia de cuerpos extraños en la
corriente sanguínea, proporciona protección contra células neoplásicas, secuestra materiales extraños en la
corriente sanguínea, produce plaquetas y similares. El linaje eritroide proporciona los glóbulos rojos, que actúan de
vehículos de oxígeno.

35 **[0089]** En otro aspecto más de la presente invención se proporciona una composición para detectar
citoblastos en una población, comprendiendo dicha composición un indicador de ACE o un fragmento de la misma y
un vehículo.

[0090] El indicador de ACE puede incluir cualquier medio de detección que pueda identificar ACE sobre un
40 citoblasto. Preferentemente, el indicador es un anticuerpo para ACE o un fragmento del mismo. Preferentemente, el
anticuerpo es como se ha descrito anteriormente y puede ser BB9.

[0091] El anticuerpo puede detectar la molécula completa de ACE o detectar secuencias de péptidos
específicas contenidas dentro de ACE. Preferentemente, el anticuerpo detectará la secuencia de péptidos SEC ID
45 N°: 1 o SEC ID N°: 2 o un equivalente de la misma.

[0092] La composición también puede comprender marcadores adicionales para distinguir células
mesenquimatosas y de queratinocitos. Para citoblastos mesenquimatosos, los marcadores adicionales pueden
incluir cualquier marcador seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, STRO, SH2, SH3 o SH4. Para
50 queratinocitoblastos, los marcadores pueden seleccionarse del grupo que incluye, pero no se limita a, citoqueratina
14, alfa-6 integrina (CD49F) y CD71.

[0093] En este documento se desvelan procedimientos de diagnóstico de afecciones asociadas a citoblastos
identificando la presencia de tipos de citoblastos en una población de células. Por ejemplo, el aumento o la
55 disminución de niveles de citoblastos hematopoyéticos puede indicar anomalías en la sangre. Esto puede ser
importante en enfermedades tales como leucemia; similarmente, los aumentos pueden traducirse en el aumento en
citoblastos que se diferencian en linajes linfoides que incluyen linfocitos T y B que indican infección. Otros
procedimientos pueden medir la expresión de ACE en leucemia u otros tumores malignos.

60 **[0094]** En este documento se desvela un procedimiento para tratar una afección asociada a citoblastos que
comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una población enriquecida de
citoblastos y en el que dicho citoblasto está asociado a la afección, preparándose dicha población enriquecida de
citoblastos mediante los procedimientos descritos en este documento.

[0095] Una "afección asociada a citoblastos" como se usa en este documento significa cualquier afección que resulta de una interacción con citoblastos.

5 **[0096]** Las composiciones de la presente invención que comprenden citoblastos aislados por los procedimientos descritos pueden usarse de varias formas.

[0097] Para citoblastos hematopoyéticos, estas células pueden usarse para reconstituir completamente un huésped inmunodeprimido tal como un huésped irradiado y/o un huésped sometido a quimioterapia; o como una
10 fuente de células para linajes específicos, proporcionándose su maduración, proliferación y diferenciación en uno o más linajes seleccionados empleando una variedad de factores que incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina, factores estimulantes de colonias, por ejemplo, FSC-GM, FSC-G o M-CSF, interleucinas, por ejemplo, IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, etc., o similares, o células del estroma asociadas a los citoblastos que se comprometen a un linaje particular, o con su proliferación, maduración y diferenciación.

15 **[0098]** Los citoblastos hematopoyéticos también pueden usarse en el aislamiento y la evaluación de factores asociados a la diferenciación y maduración de células hematopoyéticas. Por tanto, la invención engloba el uso de citoblastos hematopoyéticos en ensayos para determinar la actividad de medios tales como medios acondicionados, o para evaluar fluidos para la actividad del crecimiento celular, implicación con dedicación de linajes particulares o
20 similares.

[0099] Los citoblastos hematopoyéticos pueden usarse para el tratamiento de enfermedades genéticas. Por tanto, la invención engloba tratamiento de enfermedades genéticas asociadas a células hematopoyéticas por modificación genética de citoblastos autólogos o alogénicos para corregir el defecto genético. Por ejemplo,
25 enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, beta-talasemia, anemia de células falciformes, deficiencia de adenosina-desaminasa, deficiencia de recombinasa, deficiencia del gen regulador de la recombinasa, etc. pueden corregirse por la introducción de un gen natural en los citoblastos hematopoyéticos, tanto por recombinación homóloga como al azar.

30 **[0100]** Otras indicaciones de terapia génica son la introducción de genes de resistencia a fármacos para permitir que los citoblastos normales tengan una ventaja y sean sometidos a presión selectiva durante la quimioterapia. Genes de resistencia a fármacos adecuados incluyen, pero no se limitan a, el gen que codifica la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR).

35 **[0101]** También pueden tratarse enfermedades distintas de aquellas asociadas a células hematopoyéticas por modificación genética, en las que la enfermedad está relacionada con la falta de un producto secretado particular que incluye, pero no se limita a, hormonas, enzimas, interferones, factores de crecimiento o similares. Empleando una región de iniciación reguladora apropiada puede lograrse la producción inducible de la proteína deficiente, de manera que la producción de la proteína será paralela a la producción natural, aún cuando la producción sea en un
40 tipo de célula diferente de la que normalmente produce tal proteína. También es posible insertar una ribozima, antisentido u otro mensajero para inhibir productos génicos particulares o susceptibilidad a enfermedades, particularmente enfermedades hematolinfotrópicas.

[0102] En un aspecto adicional, en este documento se desvelan diversos procedimientos de utilización de
45 citoblastos mesenquimatosos humanos identificados y aislados o enriquecidos mediante los procedimientos de la presente invención para fines terapéuticos y/o de diagnóstico. Por ejemplo, los citoblastos mesenquimatosos humanos se usan en: (1) regeneración de tejidos mesenquimatosos que han sido lesionados por lesión aguda, expresión genética anormal o enfermedad adquirida; (2) tratamiento de un huésped con tejido mesenquimatoso lesionado mediante eliminación de pequeñas alícuotas de médula ósea, aislamiento de sus citoblastos
50 mesenquimatosos y tratamiento del tejido lesionado con CM combinados con un vehículo biocompatible adecuado para administrar CM a el (los) sitio(s) de tejido lesionado(s); (3) producción de diversos tejidos mesenquimatosos; (4) detección y evaluación de factores de crecimiento relevantes para la autorregeneración de CM y diferenciación en linajes mesenquimatosos comprometidos; (5) detección y evaluación de factores inhibidores que modulan el compromiso de CM y diferenciación en linajes mesenquimatosos específicos; y (6) desarrollo de linajes celulares
55 mesenquimatosos y ensayo de factores asociados al desarrollo de tejido mesenquimatoso.

[0103] En este documento se desvelan procedimientos de utilización de los citoblastos mesenquimatosos para corregir o modificar trastornos de tejido conjuntivo tales como la regeneración de tejido esquelético ausente o lesionado, potenciamiento de la implantación de diversos dispositivos protésicos de plástico o metal mediante la
60 unión de los citoblastos mesenquimatosos aislados sobre las superficies porosas de los dispositivos protésicos o diversos vehículos cerámicos de tri-calcio o hidroxiapatita o vehículos que, tras la activación y posterior diferenciación de los citoblastos mesenquimatosos, producen puentes óseos o viscosos naturales.

[0104] Además, en este documento se desvelan diversos procedimientos dirigidos a usar injertos de material compuesto de citoblastos mesenquimatosos para aumentar la tasa de reserva de células hematopoyéticas durante el trasplante de médula ósea. Una realización adicional de la invención se refiere a diversos procedimientos para usar injertos de material compuesto de citoblastos mesenquimatosos y cerámicas implantadas en huéspedes tales como en sitios subcutáneos en ratones sin pelo, como catalizadores para la producción de un depósito de citoblastos hematopoyéticos.

[0105] En este documento se desvela un procedimiento para reparar lesión de tejido conjuntivo. El procedimiento comprende las etapas de aplicar un extracto que contiene citoblasto mesenquimatoso o célula progenitora a un área de lesión de tejido conjuntivo en condiciones adecuadas para diferenciar las células en el tipo de tejido conjuntivo que se necesita reparar.

[0106] Las composiciones según la presente invención que contienen citoblastos mesenquimatosos son especialmente útiles para facilitar la reparación, reconstrucción y/o regeneración de un defecto de tejido conjuntivo. Tejido conjuntivo, como se usa en este documento, incluye hueso, cartílago, ligamento, tendón, estroma y músculo. Los defectos de tejido conjuntivo incluyen cualquier lesión o irregularidad en comparación con tejido conjuntivo normal que pueda producirse debido a traumatismo, enfermedad, edad, defecto de nacimiento, intervención quirúrgica, etc. Como se usa en este documento, los defectos de tejido conjuntivo también se refieren a áreas no lesionadas en las que sólo se desea el aumento cosmético. Los procedimientos y materiales en este documento se desvelan especialmente adecuados para su uso en procedimientos ortopédicos, dentales, bucales, maxilofaciales, periodontales y otros procedimientos quirúrgicos.

[0107] Aunque en una realización preferida los citoblastos mesenquimatosos se expanden en cultivo ante de uso, también es posible usar tales citoblastos mesenquimatosos sin expansión en cultivo. Por ejemplo, los citoblastos mesenquimatosos pueden derivarse de médula ósea y usarse después de la separación de los glóbulos sanguíneos de los mismos, sin expansión. Por tanto, por ejemplo, durante un procedimiento quirúrgico para reparar tejido conjuntivo usando citoblastos mesenquimatosos, la médula ósea puede obtenerse de un paciente, enriquecerse en citoblastos mesenquimatosos humanos, mediante eliminación de glóbulos sanguíneos y aislamiento usando anticuerpo para ACE, y reintroducirse al paciente durante el procedimiento. Las células derivadas de médula que contienen citoblastos mesenquimatosos que están esencialmente libres de glóbulos sanguíneos pueden entonces usarse para reparar el tejido conjuntivo del paciente.

[0108] Pueden emplearse diversos vehículos para la administración de citoblastos mesenquimatosos humanos para reparar tejido conjuntivo. Las composiciones pueden diseñarse como un parche para el tejido lesionado para proporcionar masa y andamiaje para la formación de hueso o cartílago nuevo. Las diversas composiciones, procedimientos y materiales descritos en este documento pueden usarse según la presente invención para estimular la reparación de fracturas recientes, fracturas de no unión y para promover fusión espinal. Asimismo, puede llevarse a cabo la reparación de cartílago y otros tejidos musculoesqueléticos. En el caso de fusión espinal, tales composiciones, procedimientos y materiales pueden usarse posteriormente con o sin instrumentación para promover la fusión de masa a lo largo de la lámina y procedimientos transversales y anteriores, usados para llenar una jaula de fusión para promover la fusión entre cuerpos.

[0109] Los queratinocitos aislados en la presente invención también pueden usarse para cultivo *ex vivo* para su uso en el tratamiento de quemaduras; vehículos para terapia génica para administración sistémica de agentes terapéuticos tales como, pero no se limitan a, insulina, leptina, o pueden usarse como una fuente de citoblastos que pueden ser reprogramados en otros tejidos para aplicaciones terapéuticas.

[0110] La discusión de los documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta memoria descriptiva únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere o representa que cualquier o toda esta materia forme parte de la base de la técnica anterior o sea conocimiento general común en el campo relevante a la presente invención como existió en Australia antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

[0111] Ejemplos de los procedimientos usados en la presente invención se describirán ahora más completamente. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción sólo es ilustrativa y no debe tomarse de ningún modo como una restricción a la generalidad de la invención anteriormente descrita.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de anticuerpo BB9****5 (a) Aislamiento de células de médula ósea y sangre periférica**

[0112] Se aspiró médula ósea en heparina libre de conservante del esternón y la cresta ilíaca posterior de voluntarios sanos después de obtenerse el consentimiento informado según procedimientos aprobados por el Comité de ética humana del Hospital real de Adelaida. Se aislaron células mononucleares de médula ósea (CMNMO) tras la centrifugación a 400 g sobre Ficoll (Lymphoprep, 1,077 g/dl; Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega) y se lavó dos veces por centrifugación a 4 °C en HHF (solución salina equilibrada con Hank (HBSS; Gibco/BRL, Glen Waverley, Victoria, Australia) complementada con 20 mmol/l de HEPES, pH 7,35, y 5 % de suero bovino fetal (SBF; PA Biologicals, Sidney, NSW, Australia).

[0113] Se recogió sangre periférica (SP) movilizada y se criopreservó como se ha descrito previamente [17]. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido hasta uso. El día del inmunomarcado y la clasificación de células, las ampollas de células se descongelaron rápidamente a 37 °C. Tan pronto como las células se habían descongelado se transfirieron a un tubo de fondo redondo (Falcon 2059; Becton Dickinson, Lincoln Park, Nueva Jersey) que contenía 10 ml de disolución descongelada (HBSS complementado con 2 % de BSA, citrato ácido 10 mM y 50 unidades de kunitz/ml de ADNsa). Se dejó que las células se asentaran a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugaron y se lavaron dos veces en HHF. Con el fin de eliminar cualquier material no viable, las células se aislaron tras la centrifugación sobre Ficoll como se ha descrito anteriormente. En este estudio se usaron células de 2 cohortes de pacientes, aquellas se movilizaron con ciclofosfamida a dosis alta (HDC) a una dosis de 7 mg/m² más FSC-G (5 µg/kg diariamente subcutáneamente (sc) del día 2 hasta que se completó la aféresis) y con HDC más FSC-GM (también 5 µg/kg/día sc del día 2 hasta que se completó la aféresis) [18].

[0114] Se aislaron leucocitos de sangre periférica (LSP) de la SP de donantes normales extraída en heparina libre de conservante. Brevemente, Pentaspan previamente calentado (The Boots Co., Wellington, NZ) se añadió a SP a una relación de 6,6 ml de Pentaspan a 10 ml de SP. Éstos se mezclaron por inversión y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Durante la incubación, los glóbulos rojos se sedimentaron y se recogió la capa superior que contenía LSP. Las células de esta capa se centrifugaron y se lavaron dos veces en HHF. Entonces, estas células se separaron en células mononucleares y granulocitos usando una técnica de Ficoll similar a la descrita anteriormente. Los granulocitos y los eritrocitos contaminantes se sedimentaron a través de Ficoll y, tras la eliminación de glóbulos rojos contaminantes por lisis hipertónica en 0,83 % de cloruro de amonio, los leucocitos preparados de este modo comprendieron rutinariamente >95 % de granulocitos neutrófilos.

(b) Cultivo de líneas celulares hematopoyéticas humanas

[0115] Células Jurkat, Hut 78, CEM VLB-100 y Molt-4 (todas líneas de linfocitos T), HL60 (leucemia promielocítica), K562 (eritroleucémica), Meg-01 (megacariocito), Hi Meg (megacariocito/leucemia), Nalm-6 (línea de linfocitos B), KG1 (línea celular leucémica mieloblástica), KG1a (mieloblástica), U937 (mieloide), HEL-DR⁺ (eritroleucémica) y RC2A (AML) se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco/BRL, Glen Waverley, Victoria, Australia) complementado con 10 % de SBF, penicilina (concentración final de 100 UI/ml), sulfato de gentamicina (100 µg/ml final) y glutamina 2 mM. Células UT7 (megacariocíticas/eritroleucémicas) y TF-1 se cultivaron en RPMI-1640 con 10 % de SBF con penicilina, gentamicina y glutamina como antes y 2 ng/ml de FSC-GM (generosamente donada por Amgen, Thousand Oaks, CA). Células M07e se cultivaron en Alpha MEM (modificación Alpha de medio de Eagle) complementado con 10 % de SBF con penicilina, gentamicina y glutamina como antes y 5 ng/ml de IL-3 (Amgen, Thousand Oaks, CA).

50 (c) Cultivo de líneas celulares humanas no hematopoyéticas

[0116] Se cultivaron HFF2 (células de fibroblasto) y MCF-7 (carcinoma de células de mama) en DMEM (Gibco/BRL) complementado con 10 % de SBF, penicilina, sulfato de gentamicina y glutamina. Se cultivaron MG63 (células de osteosarcoma) en Alpha MEM (Gibco/BRL) complementado con 10 % de SBF con penicilina, gentamicina y glutamina como antes.

(d) Células del estroma de la médula ósea

[0117] Las células de la médula ósea del estroma usadas para inmunización se aislaron de CMNMO STRO-1⁺ humanas purificadas por FACS como se ha descrito previamente [19]. Estas células se cultivaron en medio Alpha complementado con 20 % de SBF, penicilina (100 UI/ml), sulfato de estreptomina (100 µg/ml) y glutamina (2 mM) y con un derivado de larga vida de L-ascorbato, 2-fosfato de ácido ascórbico (ASC-2P, Sigma, St Louis, MI, EE.UU.). Las células se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂, en una estufa de incubación humidificada durante varias semanas

con cambios de medio semanales.

(e) Generación de anticuerpos monoclonales

5 **[0118]** El anticuerpo BB9 se desarrolló tras la inmunización de un ratón BALB/c con una serie de células del estroma de la médula ósea humana independientemente derivadas designadas VPH/CM resultantes de la infección de células del estroma STRO-1⁺ con un retrovirus anfitriónico que contenía el marco de lectura abierto del virus del papiloma humano (VPH) 16 E6/E7 (VPH16 E6/E7orf) [20-22]. Brevemente, ratones BALB/c se inmunizaron intraperitonealmente (IP) con entre 2 y 10 x 10⁶ células de las células de VPH/CM en PBS que contenían 50 µg de muramildipéptido (Sigma) como adyuvante. Los ratones se reforzaron dos veces con la misma dosis de células administradas IP a intervalos de tres semanas y 4 días antes de la fusión con 10⁶ células administradas intravenosamente. Entonces, los esplenocitos aislados de ratones inmunizados se fusionaron con la línea de células de mieloma murina NS-1 según procedimientos convencionales [23] y los hibridomas resultantes se seleccionaron en medio que contenía HAT [24].

15

[0119] Los hibridomas que se produjeron de la fusión se cribaron inicialmente para la producción de anticuerpos reactivos con células del estroma de VPH/CM. Esto se realizó por medio de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en células del estroma sin fijar recientes cultivadas en placas de 96 pocillos. Entonces, los anticuerpos reactivos con esta línea de células del estroma se sometieron a un cribado negativo con el fin de eliminar anticuerpos reactivos con LSP. Esto se realizó por tinción de LSP secuencialmente con los sobrenadantes del hibridoma y F(ab)₂ de oveja dirigido contra inmunoglobulina (Ig) de ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (reactivo DDAF: Silenus, Melbourne, Australia). La tinción se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc A/S, Kamstrup, Dinamarca) y el lavado después de cada etapa de incubación se logró añadiendo HHF fría seguido de centrifugación. Después del lavado final, los LSP se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo plano previamente recubiertas (30 minutos a temperatura ambiente) con poli-L-lisina (diluida 1 en 10; Sigma) y se centrifugaron de nuevo con el fin de promover la unión a células. Después de eliminar la HHF en exceso, las células se fijaron *in situ* mediante la adición de 100 µl de FACS-FIX (1 % de formalina, 2 % de glucosa y 0,02 % de azida de sodio en PBS) y posteriormente se puntuaron visualmente para reactividad de anticuerpo por examen bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus BH2-RFCA, Olympus Optical Co. Ltd. Tokyo, Japón). Entonces, los anticuerpos que fueron no reactivos con LSP se examinaron para su unión a CMNMO por medio de análisis de citometría de flujo realizado como se describe más adelante. El anticuerpo BB9 se seleccionó inicialmente basándose en su reactividad con una subpoblación secundaria de células linfoblastoides y en ensayos posteriores según su unión a una subpoblación de células CD34⁺. Tras su identificación, el hibridoma de BB9 se clonó tres veces por dilución limitante y el isotipo del anticuerpo se determinó usando un kit comercial (Böehringer Mannheim, Castle Hill, NSW, Australia). Se mostró que BB9 era del isotipo IgG₁. Todos los estudios posteriores se realizaron con anticuerpo BB9 purificado aislado del sobrenadante de cultivo de tejido gastado usando proteína A-Sepharose (Pharmacia, North Ryde, NSW, Australia) según las recomendaciones del fabricante. Los intentos por conjugar BB9 bajo condiciones estándar con derivados reactivos con amina de isotiocianato de fluoresceína (FITC) o biotina produjeron la pérdida de actividad de unión del anticuerpo. Por consiguiente, todos los análisis del patrón de unión de BB9 a células hematopoyéticas primarias y a líneas celulares representativas de diversos linajes hematopoyéticos se realizaron por medio de tinción de inmunofluorescencia indirecta.

45

(f) Inmunomarcado de células hematopoyéticas para el análisis de citometría de flujo y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS)

[0120] Antes del inmunomarcado, células hematopoyéticas primarias (CMNMO, CMNSP, LSP) o líneas celulares hematopoyéticas se incubaron en HHF complementada con 4 % de suero humano normal (Red Cross, Adelaide, South Australia; HHF-NHS) durante 30 minutos sobre hielo para bloquear los receptores de Fc. Entonces, las células se marcaron tanto con los anticuerpos individuales como simultáneamente con una combinación de MAb 50 43A1 anti-CD34 (IgG₃ de ratón; una generosa donación de Dr. H-J. Bühring, Universidad de Tübingen) [25] y anticuerpo BB9 (IgG₁ de ratón), ambos diluidos a una concentración final de 20 µg/ml en HHF. Muestras adicionales se tiñeron en paralelo con anticuerpos IgG₃ de control de no unión del mismo isotipo (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) o IgG₁ (MAb 1B5, anti-Giardia, generosamente proporcionado por Dr Graham Mayerhofer, Departamento de Microbiología, Universidad de Adelaide) tanto solos como en diversas combinaciones 55 emparejadas con los anticuerpos 43A1 y BB9 según fuera apropiado. Todas las incubaciones de anticuerpos se realizaron durante 45 minutos sobre hielo y fueron seguidas en todos los casos por dos lavados en un exceso de HHF a 4 °C. Entonces, el anticuerpo monoclonal específicamente unido se reveló por incubación con una combinación de anticuerpos de cabra específicos de isotipo óptimamente valorados dirigidos contra IgG₁ de ratón (conjugada con ficoeritrina, PE) e IgG₃ de ratón (conjugada con FITC; ambos de Caltag; San Francisco, CA). 60 Después de otros dos lavados en HHF, las células se suspendieron a aproximadamente 10⁷ /ml en tanto FACS-FIX (para análisis de citometría de flujo) como HHF fría para FACS.

[0121] Se realizó análisis de citometría de flujo de tres colores para examinar la expresión del antígeno

identificado por BB9 sobre subpoblaciones definidas de células de MO CD34⁺. La mayoría de estos análisis se realizó usando CMNMO sin fraccionar, mientras que algunos se realizaron con células CD34⁺ previamente enriquecidas por 561 Dynabeads (Dyna, Oslo) como se ha descrito previamente [26]. Se realizaron estudios adicionales con CMNMO para examinar la retención del colorante fluorescente supravital rodamina 123 (Rh123) por células CD34⁺ fraccionadas según la expresión de BB9. Las células se incubaron primero durante 45 minutos a 37 °C en HHF complementada con Rh123 (Molecular Probes Inc., Oregon) a una concentración final de 0,1 µg/ml. Después de dos lavados en HHF fría, las células se incubaron en HHF durante otros 15 minutos a 37 °C para permitir la salida de Rh123 sin unir y luego se lavaron en HHF fría-NHS. Entonces, la inmunotinción se realizó usando 43A1 y BB9 como se ha descrito anteriormente, con la excepción de que 43A1 se detectó por medio de incubación secuencial con anticuerpo de cabra específico dirigido contra IgG₃ de ratón biotilada y estreptavidina-Tricolour (SAV-TC; ambos de Caltag). La co-distribución de CD34/CD38/BB9 y CD34/CD90/BB9 se evaluó incubando primero células con 43A1 y BB9, seguido de anticuerpo dirigido contra IgG₃ de ratón-FITC y anticuerpo dirigido contra IgG₁ de ratón -Tricolour (TC) (ambos de Caltag) como antes. Entonces, las células se incubaron con un exceso de ascitis que contenía un anticuerpo IgG₁ de ratón de no unión, 3D3 [27], con el fin de bloquear los sitios en exceso sobre el anticuerpo dirigido contra IgG₁ de ratón-TC después de que se añadiera tanto Leu17-PE (CD38, IgG₁; Becton Dickinson, Mountain View, CA) como PR13_{BIOTINA} (IgG₁ anti-CD90; una generosa donación de Drs. Beth Hill y Ben Chen, Systemix Inc., Palo Alto, CA) durante otros 45 minutos. PR13_{BIOTINA} unido se localizó por una incubación final con SAV-PE (Caltag). Una alícuota de células también se tiñó en paralelo con IgG₁-PE o IgG₁-BIOTINA (Becton Dickinson) con el fin de evaluar la eficacia de la etapa de bloqueo. El análisis del ciclo celular de CMNMO se realizó marcando inicialmente células con 43A1 y BB9, luego posterior incubación con anticuerpo específico de cabra dirigido contra IgG₃ de ratón biotilada y SAV-TC y anticuerpo de cabra dirigido contra IgG₁ de ratón conjugada con PE como se ha descrito anteriormente. Entonces, las células se bloquearon con un exceso de ascitis de IgG₁ de ratón irrelevante durante 30 minutos, se lavaron dos veces en HHF, dos veces en PBS y se permeabilizaron con etanol al 70 % helado durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces en PBS y se bloquearon durante otros 30 minutos con 3 % de suero de cabra en PBS. Se añadió MAb Ki67 conjugado con FITC (Immunotech, Marsella, Francia) o control de IgG₁-FITC a la suspensión de células a una dilución final de 1 en 10 y las células se incubaron sobre hielo durante 45 minutos.

[0122] El análisis de citometría de flujo se realizó usando un citómetro de flujo Profile II o EPICS XL-MCL (Coulter Corp., Hialeah, FL). Se recogieron veinte mil eventos por muestra como datos a modo de lista y se analizaron usando el software Coulter ELITE. La clasificación de células se realizó usando un citómetro FACStar^{PLUS} (Becton Dickinson) equipado con un láser de argón que emite luz de 488 nm a 200-250 mW. La clasificación se restringió a aquellas células que, basándose en sus propiedades de dispersión de la luz, se encontraron dentro de una ventana de linfocitos/blastos definida [4]. Los umbrales para la selección de puertas de clasificación se basaron en los niveles de tinción obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo. Las células se recogieron en tubos que contenían medio Dulbecco modificado con Iscove (IMDM; Gibco/BRL) complementado con 5 % de SBF. La pureza de las poblaciones seleccionadas se evaluó por análisis de una alícuota de células clasificadas y rutinariamente fue superior al 98 %.

40 (g) Tinción de células de MO del estroma con anticuerpo BB9

[0123] Las células del estroma de médula ósea derivadas como se ha descrito anteriormente se tiñeron *in situ* con MAb BB9. Las células se cultivaron en portaobjetos de 8 cámaras de vidrio (Nunc) durante la noche a 37 °C antes de la tinción. Las células se tiñeron con anticuerpo 1B5 de control de isotipo BB9 o IgG₁ (ambos a concentraciones finales de 20 µg/ml en HHF) sobre hielo durante 45 minutos y se lavaron dos veces con HHF. El anticuerpo específicamente unido se reveló usando anticuerpo monoclonal dirigido contra IgG₁ de ratón conjugada con FITC (Caltag) a una dilución de 1 en 50 en HHF durante 30 minutos sobre hielo en la oscuridad. Después de dos lavados finales, las células se fijaron con FACS-FIX y se observaron usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BH2-RFCA).

50

(h) Purificación de células BB9⁺ de CMNMO usando citometría de flujo activada por magnetismo (MACS)

[0124] Con el fin de evaluar la expresión de antígenos específicos de linaje co-expresados con antígeno BB9, CMNMO de BB9⁺ se aislaron por medio de citometría de flujo activada por magnetismo (MACS) [28]. Brevemente, CMNMO (0,5-1 x 10⁸ células) se suspendieron en 0,5 ml de anticuerpo BB9 (20 µg/ml de concentración final) durante 45 minutos sobre hielo. Entonces, las células se lavaron dos veces en HHF y se resuspendieron en 0,5 ml de HHF que contenía una dilución 1/50 de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG₁ de ratón biotilada (Caltag) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces en tampón MACS (que comprende solución salina tamponada con fosfato (PBS) libre de Ca²⁺ y Mn²⁺ de una única concentración complementada con 1 % de BSA, 5 mmol/l de EDTA y 0,01 % de azida de sodio) y se resuspendieron en 900 µl de tampón MACS al que se añadieron 100 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Después de incubar durante 30 minutos a 4 °C se añadió conjugado de SAV-PE (1/50; Caltag) durante 15 minutos adicionales. Las células se lavaron dos veces en tampón MACS y se extrajo una pequeña alícuota para el análisis de citometría de flujo. Las

células restantes se separaron sobre una columna de lana de acero inoxidable magnética (capacidad de la columna 10^5 células; Miltenyi Biotec) según recomendaciones del fabricante. Las células BB9⁻ se recogieron como eluato de la columna, mientras que las células BB9⁺ permanecieron unidas a la matriz magnetizada. Para obtener las células BB9⁺, la columna se sacó del imán y luego se lavó con tampón MACS en un tubo. Se tomaron pequeñas muestras de cada una de las poblaciones de células BB9⁺ y BB9⁻ para el análisis citométrico para examinar la recuperación y pureza de las células en cada fracción.

[0125] Entonces, las células BB9⁺ obtenidas de la columna de MACS se incubaron con un exceso de ascitis que contenía un anticuerpo IgG₁ de ratón de no unión como se ha descrito anteriormente. Entonces, las células se tiñeron mediante la adición de los marcadores de linaje conjugados con FITC del siguiente modo: IgG₁ FITC (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca), CD7 FITC (BDIS), CD3 FITC (BDIS), CD10 FITC (Dako), CD19 FITC (Immunotech), CD33 FITC (Coulter), CD14 FITC (Dako), CD15 FITC (Immunotech), CD34 FITC (BDIS), CD61 FITC (BDIS), glicoforina A FITC (Dako) y CD71 FITC (BDIS) durante 45 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en HHF y se fijaron en FACS-FIX y se realizó el análisis de citometría de flujo usando un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Coulter Corp., Hialeah, FL). Se recogieron veinte mil eventos por muestra como datos a modo de lista y se analizaron usando el software Coulter ELITE.

(i) Ensayos clonogénicos de células progenitoras hematopoyéticas

[0126] Se ensayaron células formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos (UFC-GM), progenitores eritroides (UFR-E) y células formadoras de colonias multipotentes (mezcla de UFC) como se ha descrito previamente [29]. Brevemente, se establecieron por triplicado cultivos de 1 ml en placas de 35 mm en IMDM complementado con 0,9 % de metilcelulosa, 30 % de SBF, 1 % de BSA (fracción V; Sigma), 3 mmol/l de L-glutamina y 5×10^{-5} mmol/l de 2-mercaptoetanol. El crecimiento de colonias se estimuló mediante la adición de 10 ng de cada uno de interleucina-3 humana recombinante (IL-3), IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FSC-GM), factor estimulante de colonias de granulocitos (FSC-G), factor de citoblasto (FC) (todos los factores fueron proporcionados generosamente por Genetics Institute, Boston, MA y Amgen, Thousand Oaks, CA) y 4U de eritropoyetina (Eprex; Janssen Cilag, Auckland, Nueva Zelanda). Las UFC-GM, UFR-E y mezcla de UFC se enumeraron en el día 14 según criterios convencionales. Todos los cultivos se establecieron por triplicado sembrando 500 células por placa.

(j) Cultivo de UFC precursoras

[0127] Éste es un sistema de cultivo en suspensión dependiente de citocinas, libre de estroma, previamente informado por este laboratorio [29] que mide la generación *de novo* de UFC-GM como un índice de precursoras (UFC precursoras) de UFC-GM. Los ensayos se establecieron por triplicado de cultivos de 1 ml en 24 placas de pocillos con 10^3 células CD34⁺, CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ aisladas por FACS de tanto MO como SP movilizada. Cada cultivo de 1 ml comprendió IMDM, 30 % de SBF, 1 % de BSA, 3 mmol/l de L-glutamina, 5×10^{-5} mol/l de 2-mercaptoetanol y se complementó con los siguientes factores de crecimiento recombinantes: IL-3 (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), FSC-G y FC (cada uno a 100 ng/ml). Se añadieron factores adicionales a la misma concentración final en el día 7, y en los días 14, 21, 28, 35 y 42 los cultivos se fraccionaron 1 en 10 en medio fresco que contenía los factores de crecimiento. Las UFC-GM presentes después de 14, 21, 28, 35 y 42 días de cultivo se enumeraron como se ha descrito anteriormente y el número de células acumulado y UFC-GM en cualquier momento de tiempo dado se calculó teniendo en cuenta el factor de dilución acumulado para el cultivo con respecto al periodo de cultivo completo.

(k) Sensibilidad a proteasas del antígeno BB9

[0128] Para investigar la naturaleza del antígeno reconocido por BB9, líneas celulares hematopoyéticas humanas que se encontró que se unían a BB9 se trataron *in vitro* con una variedad de proteasas con el fin de identificar aquellas que produjeron pérdida de la unión a anticuerpo. Antes del tratamiento con enzima, las células se lavaron en HBSS (en ausencia de suero) y luego se incubaron a 10^5 células/ml durante 1 hora a 37 °C en el mismo medio que contenía las siguientes proteasas: bromelaína, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa, termolisina y tripsina a una concentración final de 20 µg/ml, quimopapaína a 100 U/ml, dispasa a 4 mg/ml y proteinasa K a 1 µg/ml. Todas las enzimas se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania) con la excepción de papaína (Sigma) y quimopapaína (Boots, Poole, RU). Después del tratamiento con proteasa, las células se lavaron dos veces en HHF y se ensayaron para la expresión de antígeno BB9 usando análisis de inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente. El tratamiento con quimopapaína de células UT7 se repitió usando una variedad de anticuerpos de control que incluían anti-CD71 (Becton Dickinson) y 9B3 (anticuerpo dirigido contra MHC clase I) para evaluar la naturaleza específica de la liberación de antígeno.

(I) Análisis de inmunoprecipitación

[0129] Se lavaron células UT7 dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron a 2×10^8 células por ml en el mismo tampón. Las células se marcaron superficialmente con 2 mCi de ^{125}I usando lactoperoxidasa como catalizador [30] durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron cuatro veces en PBS. Las células UT7 se lisaron a una concentración final de 2×10^7 células por ml con 1 % de detergente CHAPS (Sigma) en NaCl 140 mM, MgCl_2 0,5 mM, CaCl_2 0,5 mM, Tris 10 mM, pH 7,4 (tampón CHAPS) que contenía los inhibidores de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), TPCK (L-(tosilamido-2-fenil)etilclorometilcetona), TLCK (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona) y NPGb (p-nitrofenil-p'-guanidino-benzoato-HCl) (todos comprados de Sigma) durante 30 minutos sobre hielo. Los núcleos y el material celular no solubilizado se sedimentaron por centrifugación a 18.000 g durante 20 minutos y el lisado se purificó previamente durante la noche con Dynabeads de oveja dirigidas contra Ig de ratón (Dyna). Se usaron 1,5 ml de lisado para cada inmunoprecipitación usando 1B5 (control negativo del mismo isotipo) y BB9. Los anticuerpos se unieron previamente a Dynabeads de rata dirigidas contra IgG_1 de ratón M450 durante la noche usando 50 μg de anticuerpo con 50 μl (2×10^7) de perlas en 1 ml de PBS/0,1 % de BSA. Las perlas se lavaron 2x con PBS/BSA y 1x con tampón CHAPS antes de la adición al lisado celular. El lisado celular y las perlas se rotaron durante 2-3 horas a 4 °C y las perlas se eliminaron luego usando un imán Dynal MPC-6, se lavaron 3x con tampón CHAPS, se hirvieron durante 5 minutos en tampón de muestra de gel (Tris 0,0625 M a pH 6,8, 10 % de glicerol, 20 % de SDS y 0,00125 % de azul de bromofenol) y se ejecutaron en un gradiente al 4-20 % de SDS-PAGE. Los geles se ejecutaron durante la noche a 8-10 mA, se fijaron durante 30 minutos en metanol:ácido acético:agua (5:1:4), se secaron a vacío y se evaluaron por análisis con sistema de detección y cuantificación de la radiactividad (Molecular Dynamics Inc, Sunnyvale, CA) o autorradiografía a -70 °C.

1. Anticuerpo monoclonal (MAb) BB9 se une a una subpoblación secundaria de CMNMO CD34⁺

[0130] El anticuerpo monoclonal murino BB9 se generó tras la inmunización con células del estroma derivadas de MO humana y se identificó en el cribado de hibridoma inicial basándose en su reactividad con el inmunogén y la falta de unión significativa a CMSP. El examen de células del estroma inmunomarcadas por microscopía fluorescente reveló un patrón puntiforme delicado de BB9, que pareció estar restringido a la superficie celular. El análisis de citometría de flujo confirmó la reactividad de nivel muy bajo con CMSP, pero demostró la unión de BB9 a una subpoblación secundaria (promedio de $9,9 \pm 2,2$ %; $n = 10$) de células en MO humana adulta caracterizada por propiedades de dispersión de la luz directa baja y perpendicular baja (Fig. 1A). Los posteriores análisis de inmunofluorescencia de dos colores de células mononucleares de médula ósea adulta con BB9 y anticuerpo anti-CD34 revelaron la unión de BB9 a una subpoblación de células CD34⁺ (media 22,4; intervalo 8,3 - 40,8 %, $n = 10$). Significativamente, la intensidad de tinción de BB9 fue mayor en células que presentaron la mayor densidad de antígeno CD34 (Fig. 1 B). Además, aunque una pequeña proporción de células CD34⁻ expresaron BB9, la intensidad de tinción de BB9 sobre estas células fue coherentemente inferior a la expresada por células CD34⁺.

[0131] Para determinar la identidad de otras células (CD34⁻) que también se unieron a BB9, las células BB9⁺ se aislaron de CMNMO por medio de citometría de flujo activada por magnetismo (MACS) y luego se tiñeron con cada uno de un panel de MAb específicos para linajes hematopoyéticos particulares. Como se muestra en la Tabla 1, aproximadamente un tercio ($39,8 \pm 20,5$ %; $n = 3$) de CMNMO identificadas por BB9 son linfocitos B como se demuestra por su expresión de CD19. Una proporción significativa de células BB9⁺ también co-expresó el antígeno linfocitoide T CD7 ($18,8 \pm 7,6$ %; $n = 3$), el marcador mielocítico CD33 ($10,6 \pm 6,1$ %; $n = 3$) y otro 11,7 % de células también se tiñeron con anticuerpo anti-CD71. Proporciones inferiores (entre el 1 - 6 % de las células) co-expresaron CD3, CD14, CD61 y glicoforina A.

La Tabla 1 muestra antígenos de linaje expresados por CMNMO BB9⁺.

Marcador de linaje	Media \pm EEM
CD7	18,8 \pm 7,6
CD3	5,7 \pm 2,8
CD19	39,8 \pm 20,5
CD33	10,6 \pm 6,1
CD14	1,3 \pm 0,3
CD34	9,8 \pm 7,7
CD61	2,0 \pm 1,0
Glicoforina A	2,0 \pm 0,2
CD71	11,7 \pm 7,1

[0132] Células BB9⁺ se purificaron a partir de CMNMO usando MACS como se ha descrito. Las células se tiñeron para detectar BB9 usando anti- IgG_1 de ratón-biotina y SAV-PE, y otros antígenos de linaje con anticuerpos directamente conjugados con FITC. La co-expresión de estos marcadores con BB9 se visualizó usando análisis con

el software Coulter Elite. Se analizaron 20.000 eventos para cada muestra. Los datos representan la proporción de células BB9⁺ (% , media ± EEM de tres muestras de MO independientes) que co-expresan los antígenos de linaje respectivos.

- 5 **[0133]** Para investigar la naturaleza de las células CD34⁺ identificadas por BB9 se empleó FACS de dos colores para aislar subpoblaciones de CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ según las regiones de clasificación mostradas en la Figura 2. Cada subpoblación se ensayó para contenido de células progenitoras hematopoyéticas clonogénicas en cultivos semi-sólidos convencionales. Los datos de 8 experimentos (resumidos en la Tabla 2) demuestran que los progenitores mieloides (UFC-GM) están presentes en tanto subpoblaciones de CD34⁺BB9⁺ como de CD34⁺BB9⁻. No fueron evidentes diferencias significativas (p = 0,63) en la incidencia de UFC-GM entre estas dos subpoblaciones o entre cualquier subpoblación como células CD34⁺ sin fraccionar (CD34⁺ frente a CD34⁺BB9⁺ p = 0,44; CD34⁺ frente a CD34⁺BB9⁻ p = 0,87). Similarmente, también se detectaron progenitores eritroides (UFR-E) en ambas subpoblaciones, aunque hubo una reducción relativa en la incidencia de UFR-E dentro de la fracción de CD34⁺BB9⁺ con respecto a tanto las células CD34⁺ totales (p = 0,03, prueba de la t de datos emparejados) como a la fracción CD34⁺BB9⁻ (p = 0,01).

La Tabla 2 muestra la incidencia de progenitores clonogénicos dentro de fracciones de células CD34⁺, CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻.

Fuente de células	Tipo de célula	UFC-GM	UFR-E	Mezcla de UFC
Médula ósea (n = 8)	CD34 ⁺	232,1 ± 67,6	81,5 ± 39,2	4,5 ± 3,2
	CD34 ⁺ BB9 ⁺	277,1 ± 114,1	38,7 ± 33,6	3,7 ± 5,1
	CD34 ⁺ BB9 ⁻	239,0 ± 137,7	88,1 ± 25,3	4,2 ± 2,8
Sangre movilizada (n = 6)	CD34 ⁺	198,0 ± 119,1	185,7 ± 96,8	2,2 ± 0,9
	CD34 ⁺ BB9 ⁺	198,8 ± 142,1	89,5 ± 53,2	1,0 ± 1,1
	CD34 ⁺ BB9 ⁻	142,8 ± 69,1	245,8 ± 151,7	1,3 ± 2,4

- 20 **[0134]** Células CD34⁺ de donantes de médula ósea normales (n = 8) o muestras de sangre periférica movilizada (n = 6, 3 de HDC + FSC-G y 3 de HDC + FSC-GM) se separaron en subfracciones de BB9⁺ y BB9⁻. Las células se sembraron en cultivos de metilcelulosa que contenían IL-3, IL-6, FSC-G, FSC-GM, FC y Epo durante 14 días a 37 °C/5 % de CO₂. Las colonias se identificaron *in situ* y sus tipos se abrevian del siguiente modo: UFC-GM = granulocito y/o macrófago; UFR-E = eritroide; mezcla de UFC = colonias mixtas que contienen células eritroides y mieloides y/o megacariocito. Los datos numéricos representan la media (± desviación estándar) de colonias por 1000 células de cada fenotipo sembrado.

- 30 **[0135]** También se identificaron progenitores multipotentes (mezcla de UFC) en tanto fracciones de CD34⁺BB9⁺ como de CD34⁺BB9⁻, pero no se observó tendencia coherente en su incidencia en ninguna subpoblación (Tabla 2). La corrección de la incidencia de las subpoblaciones de BB9⁺ y BB9⁻ dentro de la población de CD34⁺, la recuperación de UFC-GM, UFR-E y mezcla de UFC en la subpoblación de CD34⁺BB9⁺ fue 33,8 ± 6,2 %, 13,8 ± 3,9 % y 24,5 ± 12,8 %, respectivamente.

35 **2. CPH jerárquicamente primitivas expresan el antígeno identificado por BB9**

- [0136]** Con el fin de investigar la expresión de BB9 sobre CPH jerárquicamente primitivas se realizó una serie de procedimientos de inmunomarcado de 3 colores. Como se muestra en el panel B de la Figura 2, la expresión del antígeno BB9 guarda relación inversa con la de CD38, encontrándose los mayores niveles en células CD34⁺CD38⁻ y los menores en la población de CD34⁺CD38⁺. Además, como se muestra en el panel C de la Figura 2, la unión de BB9 se co-distribuye a un grado significativo con la de CD90 (Thy-1); representando CD34⁺CD90⁺ un fenotipo previamente mostrado que contiene la mayoría de LTC-IC y células con la capacidad de injertarse funcionalmente en ratones inmunodeficientes letalmente irradiados [7]. Células CD34⁺ con baja retención de Rh123 (CD34⁺Rh123^{sin brillo}) son prácticamente todas BB9⁺ y además demuestran niveles marcadamente superiores de expresión de antígeno BB9 que los presentados por células CD34⁺Rh123^{brillantes} (Fig. 2, panel A). Para investigar el estado del ciclo celular de células CD34⁺ que co-expresan antígeno BB9 se realizó análisis de citometría de flujo de 3 colores de CMNMO en combinación con MAb Ki67. Ki67 detecta un antígeno nuclear presente sólo en células proliferantes en fases G₁, S, G₂ y M del ciclo celular, pero no en Go [31]. Como se muestra en la Figura 3A, Ki67 se une a aproximadamente el 55 % de células CD34⁺. El resto de células CD34⁺ que fracasan en unirse a Ki67 (región R1 de la Figura 3A) se definen como células Go. El análisis de archivos de datos a modo de lista permitió el examen del patrón de expresión de BB9 sobre células CD34⁺Ki67⁺ (dentro de R2) y células CD34⁺Ki67⁻ (dentro de R1). El panel B de la Figura 3 demuestra que las células progenitoras hematopoyéticas no proliferantes (CD34⁺Ki67⁻; dentro de R1 de Fig. 3A) presentan el mayor nivel de expresión de BB9, con el 79 % considerado BB9⁺. A diferencia, las células

proliferantes (Ki67⁺, dentro de R2 de la Figura 3A) presentan expresión de bajo nivel de BB9 (Figura 3C).

[0137] Colectivamente, por tanto, estos datos demuestran que las células CD34⁺BB9⁺ presentan varias características fenotípicas previamente atribuidas a CPH humanas primitivas. Para investigar adicionalmente la expresión del antígeno BB9 sobre CPH jerárquicamente primitivas (UFC precursoras), subpoblaciones de CMNMO CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ se ensayaron para su capacidad para iniciar y sostener la hematopoyesis en suspensión dependiente de citocinas libre de estroma como se ha descrito previamente [29]. Las fracciones clasificadas se cultivaron en una combinación de IL-3, IL-6, FSC-G y FC (36GS) [29] y se ensayaron a intervalos semanales durante un periodo de 6 semanas para la producción de UFC-GM y células mieloides maduras. La Figura 4 es un resumen de los datos de 10 experimentos. La producción de UFC-GM (panel A) fue significativamente mayor de la subpoblación de CD34⁺BB9⁺ que de CD34⁺BB9⁻ en todos los momentos de tiempo medidos (los valores de p oscilan de 0,0004 a 0,008) con la excepción del día 35. Al cese de los cultivos (día 42), el número medio de UFC-GM generadas a partir de 10³ células CD34⁺BB9⁺ fue 2,2 x 10⁵ ± 1,2 x 10⁵, mientras que el mismo número de células CD34⁺BB9⁻ sólo produjo una media de 7812 colonias. De acuerdo con esto, la producción correspondiente de células mieloides en maduración fue mayor a partir de la subpoblación de BB9⁺ en todos los momentos de tiempo (los valores de p de 0,027 a 0,55), conduciendo a la generación de una media de 2,5 x 10⁶ células en el día 42 (Fig. 4B). Por tanto, estos datos demuestran que CPH primitivas con la capacidad para iniciar y sostener hematopoyesis bajo estas condiciones de cultivo están limitadas a una subpoblación de células CD34⁺ identificadas por MAb BB9.

20 3. El antígeno identificado por BB9 se expresa a altos niveles por células CD34⁺ en sangre periférica movilizada

[0138] El patrón de unión de BB9 a células CD34⁺ se analizó en sangre en estado estacionario y sangre periférica movilizada (SPM). Estos estudios se realizaron usando muestras obtenidas de donantes normales o pacientes en los que la movilización de células progenitoras de la sangre se indujo tras la administración de tanto ciclofosfamida a dosis alta (HDC) seguida de FSC-G como con HDC más FSC-GM. El análisis de sangre en estado estacionario reveló que BB9 se unió a aproximadamente el 5 % de células CD34⁺ (5,08 % ± 0,58; n = 4), una proporción significativamente menor de la previamente observada para células CD34⁺ de MO en estado estacionario (p = 0,026). A diferencia, se encontró que una proporción coherentemente mayor de células CD34⁺ en sangre periférica movilizada se unía a BB9 (Fig. 5). El antígeno BB9 presentó una media de 48,4 % ± 4,3 (n = 3) de células CD34⁺ provocadas por HDC + FSC-G y 54,7 % ± 2,9 (n = 3) de aquellas movilizadas por la combinación de HDC + FSC-GM, aproximadamente el doble de la proporción observada en la población de CD34⁺ aislada de MO en estado estacionario (véase la Tabla 3) y significativamente 4-5 veces superior a la presente en sangre en estado estacionario (p = 0,0013). Además, la densidad de antígeno BB9 en ambas poblaciones de células CD34⁺ movilizadas fue superior a la de las células CD34⁺ en sangre periférica en estado estacionario.

La Tabla 3 muestra la expresión de BB9 en sangre movilizada, médula ósea adulta normal y sangre periférica en estado estacionario.

Tipo de donante (n)	Células mononucleares que expresan BB9	Células BB9 ⁺ que expresan CD34	Células CD34 ⁺ que expresan BB9 ⁺
HDC + FSC-G (3)	19,9 ± 3,5	15,3 ± 6,2	48,4 ± 4,3
HDC + FSC-GM (3)	28,0 ± 7,6	34,4 ± 9,7	54,7 ± 2,9
MO normal (10)	9,9 ± 2,2	17,0 ± 4,3	22,4 ± 3,3
SP normal (4)	4,7 ± 0,6	3,3 ± 2,0	5,1 ± 0,6

[0139] Se marcaron muestras con el Mab anti-CD34 43A1 (IgG₃) y BB9 (IgG₁) o en paralelo con Mab de control del mismo isotipo, luego se visualizaron por marcado posterior con anticuerpos específicos de isotipo contra IgG₃ de ratón (conjugada con FITC) e IgG₁ de ratón (conjugada con PE). Se adquirieron los datos de al menos 20.000 células, luego se analizaron usando el software Coulter ELITE. Los datos representan la proporción (%, media ± EEM) de células que expresan el antígeno indicado de células aisladas de las fuentes de donantes respectivas (movilización tras la ciclofosfamida a dosis alta [HDC] + FSC-G o +FSC-GM; médula ósea adulta normal; o sangre periférica de adulto en estado estacionario).

[0140] Los ensayos clonogénicos realizados en subpoblaciones de CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ aisladas por FACS de cada una de las seis muestras de sangre movilizada demostraron un reparto cualitativamente similar de UFC-GM y UFR-E en las fracciones de BB9⁺ y BB9⁻ al encontrado en MO (Tabla 2). UFC-GM se encontraron a una incidencia similar dentro de tanto fracciones de CD34⁺BB9⁺ como de CD34⁺BB9⁻. Sin embargo, de acuerdo con las muestras de MO, UFR-E estaban significativamente agotadas en la fracción de células CD34⁺BB9⁺ con respecto a la fracción de células CD34⁺BB9⁻ (p = 0,033). Para las muestras de HDC + FSC-G, 49,4 % ± 12,8 (intervalo del 25,8 - 70,0 %) de UFC-GM y 21,3 % ± 13,2 (intervalo del 0 - 45,4 %) de UFR-E se recuperaron en la subpoblación de CD34⁺BB9⁺. Similarmente, para las tres muestras de HDC + FSC-GM, la subpoblación de CD34⁺BB9⁺ contuvo una

media de 65,9 % \pm 1,9 (intervalo 62,2 - 68,0 %) de UFC-GM y 36,6 % \pm 9,3 (intervalo del 19,5 - 51,3 %) de UFR-E.

[0141] Como se muestra para las células de MO, el ensayo de UFC precursoras de células CD34⁺BB9⁺ y CD34⁺BB9⁻ aisladas de SPM demostró la mayor generación de tanto UFC-GM (panel A, Fig. 6) como células mieloides en maduración (panel B, Fig. 6) a partir de la subpoblación BB9⁺ que de la subpoblación de BB9⁻ en todos los momentos de tiempo medidos. Al cese de los cultivos (día 35), el número medio de UFC-GM generado a partir de 10³ células CD34⁺BB9⁺ fue 12,497 \pm 7,764, mientras que el mismo número de células CD34⁺BB9⁻ sólo produjo 119 \pm 82 colonias. La producción correspondiente de células mieloides en maduración fue superior a partir de la subpoblación de CD34⁺BB9⁺ en todos los momentos de tiempo conduciendo a la generación de una media de 7,5 x 10⁶ células en el día 35 en comparación con 1,2 x 10⁶ a partir de células CD34⁺BB9⁻ (Fig. 6). Por tanto, estos datos demuestran que en SP movilizada como en MO, las CPH primitivas están restringidas a una subpoblación de células CD34⁺ identificadas por MAb BB9.

4. BB9 identifica una glicoproteína sensible a quimopapaína de peso molecular 160 kDa.

[0142] También se investigó la unión de BB9 a líneas celulares leucémicas que representan una variedad de linajes hematopoyéticos y otras líneas celulares. Como se muestra (Tabla 3), BB9 se unió a altos niveles a varias líneas celulares que incluyen HL60, K562, Meg-01, UT7, MG63 y células de fibroblasto dérmico. La expresión de baja a intermedia del antígeno BB9 se observó en las líneas celulares KG1, RC2A y MCF-7 y sobre la línea de linfocitos B Nalm-6, mientras que KG1a, MO7e y las líneas de linfocitos T Jurkat, Hut 78, CEM VLB-100 y Molt-4 fueron todas negativas. Como el mayor nivel de expresión del antígeno BB9 se observó coherentemente en células UT7 dependientes de FSC-GM, esta línea se usó en todos los estudios posteriores para investigar la naturaleza del antígeno. Para determinar si BB9 identificó un epítipo de proteína, células UT7 se trataron con una gama de proteasas con el fin de identificar aquellas que previnieron la posterior unión de BB9 como se ha evaluado por citometría de flujo. Bromelaína, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa, proteinasa K, tripsina y termolisina no tuvieron efecto en este ensayo, pero la quimopapaína derogó completamente el marcado específico con BB9 como también se observó para CD71, que se usó como control positivo en este ensayo (datos no mostrados). Además, el tratamiento con PI-PLC, a la vez que eliminó eficientemente CD59 y CD90 de células UT7 (datos no mostrados), no alteró la unión de BB9 demostrando que el epítipo de BB9 no se expresa en una glicoproteína ligada a GPI. Finalmente, BB9 inmunoprecipitó una glicoproteína de células UT7 marcadas con ¹²⁵I de superficie con un peso molecular aparente bajo condiciones reductoras de 160 kDa (Fig. 7).

[0143] Aunque se ha identificado una amplia variedad de moléculas de la superficie celular sobre células hematopoyéticas maduras, se ha demostrado que es más difícil identificar antígenos de superficie que están restringidos a citoblastos hematopoyéticos y células progenitoras en tejidos hematopoyéticos humanos. Esto puede ser debido en parte tanto a limitaciones prácticas tales como los números limitados de CPH disponibles para la inmunización y el cribado, pero igualmente y, lo que es más importante, a la co-expresión bien documentada sobre tanto células hematopoyéticas primitivas como maduras de una amplia variedad de antígenos de superficie cuya presencia sobre la población de CPH inmunizantes puede dominar, por consiguiente, la respuesta inmunitaria que hace que la identificación de antígenos restringida a CPH sea mucho más improbable. En un intento por evitar estos problemas, los inventores eligieron inmunizar ratones con células del estroma de médula ósea, una fuente abundante de células para la inmunización que carece de muchos de los antígenos compartidos con células hematopoyéticas maduras, pero que presentan muchos de los antígenos de superficie celulares expresados sobre citoblastos hematopoyéticos y células progenitoras que incluyen CD34 [12,13] CD90 [14], CD164 [15] y, en el ratón, Sca-1 [16]. Por tanto, los inventores plantearon como hipótesis que la inmunización con células del estroma de médula ósea podía provocar anticuerpos para antígenos adicionales co-expresados por estas células y CPH primitivas y en cumplimiento de esta hipótesis los inventores desarrollaron el anticuerpo monoclonal BB9.

[0144] Los inventores han mostrado que BB9 se une a aproximadamente el 10 % de células mononucleares de médula ósea, presentando el 60 % antígenos restringidos a linfocitos T o B, mientras que aproximadamente el 20 % co-expresan CD34. Aunque fenotípicamente diversa, la población de BB9⁺ como conjunto es no proliferante como se demuestra por niveles de bajos a indetectables de expresión de CD71 y falta de inmunotinción con Ki67 que detecta un antígeno nuclear presente sólo durante las fases G₁, S, G₂ y M de ciclo celular, no en G₀ [31]. Significativamente, dentro de la población de CD34⁺ de MO, solo el 20 % de las células presentan el antígeno BB9, pero dentro de esta subpoblación están incluidas la gran mayoría de células con fenotipo de citoblastos hematopoyéticos candidatos como se identifica por su falta de CD38 [6], baja retención de Rh123 [32] y expresión de CD90 [8]. De acuerdo con estos datos, ensayos funcionales demostraron adicionalmente que CPH primitivas con la capacidad para iniciar y sostener la hematopoyesis en cultivo libre de células del estroma dependientes de citocinas se restringieron a la subpoblación de CD34⁺BB9⁺. Se hicieron observaciones similares con muestras de citoblastos de sangre movilizada por dos pautas diferentes sugiriendo que la especificidad de BB9 para CPH primitivas observada en MO también se extiende a sangre periférica movilizada. De importancia, una proporción significativamente mayor de células CD34⁺ en SPM fueron BB9⁺ que la encontrada en SP en estado estacionario, sugiriendo que las dos pautas investigadas movilizan específicamente células CD34⁺BB9⁺. Previamente se han

hecho observaciones análogas con respecto a CD90, que se expresa similarmente sobre una proporción significativamente mayor de células CD34⁺ en sangre movilizada que en la MO [33].

[0145] Se mostró que el epítipo identificado por BB9 residía sobre una glicoproteína de la superficie celular de 160 kDa que no había sido liberada por PI-PLC ni tras tratamiento con una gama de proteasas, con la excepción de quimopapaína. El peso molecular calculado del antígeno BB9 es similar al de MDR-1, una glicoproteína de 170 kDa que previamente se mostró que se expresaba por CPH humanas primitivas [34]. Sin embargo, la falta de reactividad de BB9 con leucocitos de sangre periférica (LSP) se distingue de la de MDR-1, que se expresa por 40-65 % de LSP [35]. Además, de acuerdo con su fenotipo resistente a vinblastina, la línea linfocida T VLB-100 [36] presenta alto nivel de expresión de MDR-1, pero se mostró que no se unía a BB9 a niveles detectables. Por tanto, estos datos sugieren que BB9 no identifica MDR-1. Otras glicoproteínas de la superficie celular con patrones de expresión restringidos aparentemente similares sobre CPH humanas primitivas para el antígeno identificado por BB9 incluyen CD90 [8], AC133 [9,11], Flt3/flk-2 (CD135) [37], Tie-1 [38], KDR [39], TEK [11]. Sin embargo, es poco probable que éstas se correspondan con el antígeno BB9 basado en varios criterios que incluyen diferencias en el peso molecular (Thy-1 [7,8], AC133 [40], Tie-1 [43], TEK [41], KDR [42]) y patrones de expresión tanto en células hematopoyéticas primarias [37,44] como en líneas celulares hematopoyéticas [38].

[0146] Es interesante la distribución restringida del antígeno BB9 dentro de tejidos hematopoyéticos, es decir, progenitores hematopoyéticos primitivos y células del estroma de médula ósea, un patrón de expresión también presentado por varios otros antígenos que incluyen CD34 [12,13], CD90 [14], CD164 [15] y Sca-1 [16]. Dadas las propiedades adhesivas de al menos 3 de estas glicoproteínas [45-48], es tentador especular que BB9 también puede funcionar como molécula de adhesión. Estudios iniciales demuestran que BB9 también se une a células endoteliales vasculares en tejidos hematopoyéticos tales como bazo, timo y amígdala, un hallazgo que no está de acuerdo con una función adhesiva propuesta. Sin embargo, MAb BB9 no perturba la adhesión de células CD34⁺ a células del estroma de médula ósea *in vitro* (HR, PJS; observación no publicada). Las respuestas a la pregunta de la función del antígeno BB9 en el sistema hematopoyético se beneficiará tanto de caracterización bioquímica adicional de la glicoproteína como en última lugar del aislamiento de un ADNc correspondiente al antígeno. Tales estudios están actualmente en progreso.

30 **La Tabla 4 muestra la expresión de BB9 sobre líneas celulares hematopoyéticas y otras líneas celulares.**

Línea celular	Reactividad	Características de la línea celular
UT7	++	Leucemia eritroblástica/megacariocítica
TF-1	+/-	Eritroleucemia
K562	++	Leucemia eritroblástica, Ph+ (CML)
MEG-01	++	Leucemia megacariocítica Ph+ (CML)
MO7e	-	Leucemia megacariocítica
HEL-DR	++	Eritroleucemia
Hi MEG	+	Leucemia megacariocítica
KG-1	+	Leucemia mieloblástica
KG-1a	-	Sublínea inmadura de KG-1
HL60	++	Leucemia mieloblástica
U937	+	Leucemia histiocítica
RC2A	+	AML
Nalm-6	+	Linfocito B
Hut78	-	Linfocito T
Jurkat	-	Linfocito T
Molt-4	-	Linfocito T
CEM VLB-100	-	Linfocito T
Fibroblastos dérmicos	+++	Fibroblasto
MCF-7	+	Carcinoma de mama
MG63	++	Osteocarcinoma

[0147] Se usó inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de BB9. Se incubaron células con MAb BB9 a 20 µg/ml durante 45 minutos y con anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG₁ de ratón conjugada con PE. Se adquirieron al menos 10.000 acontecimientos en un citómetro de flujo Coulter XL para cada línea celular examinada y la proporción de células positivas para BB9 se cuantificó del siguiente modo:

- = 0-2 %, +/- = 2-5 %, + = 5-35 %, ++ = 35-80 %, +++ = 80-100 %.

[0148] En resumen, los inventores han descrito un anticuerpo monoclonal, BB9, con especificidad por una glicoproteína de la superficie celular co-expresada por células del estroma de médula ósea y CPH humanas primitivas dentro de MO adulta y sangre movilizada. La expresión del antígeno BB9 dentro de sangre del cordón umbilical, hígado fetal y durante la hematopoyesis embrionaria está actualmente en investigación. A este respecto, la posibilidad de que BB9 presente unión a células CD34⁺ con actividad de citoblasto es de particular interés.

Ejemplo 2: Células aisladas identificadas por anticuerpo BB9 y trasplante de las células.

10 **[0149]** Se aislaron células mononucleares de muestras de sangre del cordón umbilical humano por sedimentación por densidad sobre Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/ml) según procedimientos convencionales. Antes del inmunomarcado, las células mononucleares de la sangre del cordón (CMNSC) se incubaron en PBS complementado con albúmina de suero humano (HAS; Baxter Healthcare) y 100 µg/ml de globulina gamma humana normal agregada (sandoglobulina) durante 30 minutos sobre hielo para bloquear receptores de Fc. Entonces, las
15 células se marcaron tanto con los anticuerpos individuales como simultáneamente con una combinación del MAb anti-CD34 43A1 (IgG₃ de ratón; una generosa donación de Dr. H-J. Bühring, Universidad de Tübingen) y anticuerpo BB9 (IgG₁ de ratón), ambos diluidos a una concentración final de 20 µg/ml en PBS-HSA. Muestras adicionales se tiñeron en paralelo con anticuerpos IgG₃ de control de no unión del mismo isotipo (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) o IgG₁ (MAB 1B5, anti-Giardia, generosamente proporcionado por Dr Graham
20 Mayerhofer, Departamento de Microbiología, Universidad de Adelaida) tanto solo como en diversas combinaciones en pares con los anticuerpos 43A1 y BB9 según fuera apropiado. Todas las incubaciones de anticuerpo se realizaron durante 45 minutos sobre hielo y fueron seguidas en todos los casos de dos lavados en un exceso de PBS-HAS a 4 °C. Entonces, el anticuerpo monoclonal específicamente unido se reveló por incubación con una combinación de anticuerpos de cabra específicos de isotipo óptimamente valorado dirigidos contra IgG₁ de ratón
25 (conjugada con ficoeritrina, PE) e IgG₃ de ratón (conjugada con FITC; ambos de Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL, EE.UU.). Después de otros dos lavados en PBS-HAS, las células se suspendieron a aproximadamente 10⁷ células/ml en PBS-HSA frío para FACS.

30 **[0150]** Las células se clasificaron en fracciones de CD34⁺, CD34⁺/BB9⁺ y CD34⁺/BB9⁻ según las puertas indicadas. Las células clasificadas se trasplantaron en ratones NOD/SCID irradiados (400cGy) a una dosis de 50 – 100.000 células por ratón junto con 10⁷ CMNSC agotadas en CD34 irradiadas como células de vehículo. El injerto funcional se evaluó en la semana 6 después del trasplante por análisis de citometría de flujo de médula ósea y sangre periférica (Figura 8) a partir de los ratones NOD/SCID trasplantados con anti-CD45-FITC específico humano en combinación por pares con IgG₁ de cualquier isotipo-PE, CD11b-PE, CD19-PE o CD34-
35 PE (todos los reactivos de Becton-Dickinson). Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de injerto funcional en la semana 6 después del trasplante

Población	% de células CD45+ humanas (semana 6)
CD34+	15 ± 6,5
CD34+BB9+	12 ± 5
CD34+BB9-	0,25 ± 0,03

40 LISTA DE SECUENCIAS

[0151]

<110> The Peter MacCallum Cancer Institute Simmons, Paul J
45 <120> Identificación y aislamiento de citoblastos somáticos y usos de los mismos
<130> 649197
<160> 2
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
50 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> PÉPTIDO
55 <222> (1)..(10)
<223>
<400> 1

Leu Phe Gln Glu Leu Gln Pro Leu Tyr Leu
1 5 10

<210> 2
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(8)
 10 <223>
 <400> 2

Glu Ala Asp Asp Phe Phe Thr Ser
1 5

15 REFERENCIAS

[0152]

1. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD,
 20 Bernstein ID, Thomas ED (1991) Engraftment after infusion of CD34⁺ marrow cells in patients with breast cancer or
 neuroblastoma. *Blood*: 1717
2. Civin CI, Trischmann T, Fackler M, Bernstein I, Brunning J, Campos L, Greaves M, Kamoun M, Katz D, Lansdorp
 P, Look A, Seed B, Sutherland D, Tindle R, Uchanska-Ziegler B (1989) Report on the CD34 cluster workshop, in
 Knapp W, Dorken B, Golk W, Rieber E, Stein H, Schmidt R, von dem Borne A (eds): *Leukocyte Typing IV*. Oxford,
 25 Oxford Press,
3. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): CD34: Structure, Biology and Clinical Utility. *Blood* 87:1
4. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989) Characterization and partial purification
 of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74:1563
5. Brandt J, Baird N, Lu L, Srour E, Hoffman R (1988) Characterization of a human hematopoietic progenitor cell
 30 capable of forming blast cell containing colonies in vitro. *J.Clin Invest* 82:1017
6. Huang S, Terstappen LWMM (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLA-DR⁺,
 CD38⁻ hematopoietic stem cells. *Blood* 83:1515
7. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle A-M, Peault B (1992) Isolation of a candidate human
 hematopoietic stem-cell population. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 89:2804
8. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM (1993) Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J.*
 35 *Exp. Med.* 177:1331
9. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. (1997)
 AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 15:5002
10. Bühring HJ, Seiffert M, Bock TA, Scheduling S, Thiel A, Scheffold A, Kanz L, Brugger W (1999) Expression of novel
 40 surface antigens on early hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 872:25
11. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren
 JA, Gagen D, Fairbairn LJ, Lord BI, Testa NG (1998) CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly
 enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*
 16:387
12. Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow.
 45 *Blood* 78:2848
13. Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo G-R, Terstappen L (1995) The "common stem
 cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal
 progenitors. *Blood* 85:2422
14. Gronthos S, Simmons PJ (1996) The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J.*
 50 *Hematotherapy* 5:15
15. Zannettino ACW, Bühring H-J, Niuitta S, Ashman LK, Känz L, Simmons PJ (1995) Identification and functional
 cloning of MGC-24, a mucin-like molecule expressed by haemopoietic progenitors and bone marrow stromal cells: A
 negative regulator of haemopoiesis. *Blood* 86:591 a (abstract)
16. Satoh M, Mioh H, Shiotsu Y, Ogawa Y, Tamaaki T (1997) Mouse bone marrow stromal cell line MC3T3-G2/PA6
 55 with hematopoietic-supporting activity expresses high levels of stem cell antigen Sca-1. *Exp. Hematol.* 25:972
17. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE,
 Juttner CA (1990) Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem
 cells from the peripheral blood. *Exp. Hematol.* 18:442

18. Dyson PG, Jackson KA, McClure BJ, Rawling TP, To LB (1996) Increased levels of megakaryocyte progenitors in peripheral blood mobilised by chemotherapy and/or haemopoietic growth factor protocols. *Bone Marrow Transp.* 18:705
19. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84:4164
20. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991) The E7 gene of human papillomavirus type-16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65:473
21. Kaur P, Halbert CL (1995) Immortalization of human keratinocytes with human papilloma virus DNA. *Methods Cell Sci.* 17:117
22. Simmons PJ, Gronthos S, Ohta S, Graves SE (1995) Human bone marrow stromal cell precursors: identification and development potential. *Bone Marrow Transp.* 15 Supp 1:S3
23. Köhler E, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495
24. Goding JW (1980) Antibody production by hybridomas. *J. Imm. Meth.* 39:285
25. Bühring HJ, Burkhardt M, Ning Y, Müller CA (1995) Reactivity patterns and epitope mapping of CD34 panel mAbs, in Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF, Todd RF (eds): *Leukocyte Typing V.* Oxford, Oxford Press, p 847
26. Baird PN, Simmons PJ (1996) Expression of the Wilms' Tumour gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 25:312
27. O'Connor CG, Ashman LK (1982) Application of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugated anti-immunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *J. Imm. Meth.* 54:267
28. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231
29. Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ (1992) Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 80:1405
30. Marchalonis JJ (1969) An enzymatic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* 113:299
31. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J. Immunol.* 133:1710
32. Spangrude GJ, Johnson GR (1990) Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *P.N.A.S. (U.S.A.)* 87:7433
33. Murray L, Chen B, Galy A, Chen S, Tushinski R, Uchida N, Negrin R, Tricot G, Jagannath S, Vesole D, Barlogie B, Hoffman R, Tsukamoto A (1995) Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 85:368
34. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66: 85
35. Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2735
36. Beck WT, Mueller TJ, Tanzer LR (1979) Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* 39:2070
37. Rappold I, Ziegler BL, Köhler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino ACW, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Bühring H-J (1997) Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing Flt3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90:111
38. Kukk E, Wartiovaara U, Gunji Y, Kaukonen J, Bühring H-J, Rappold I, Matikainen M-T, Vihko P, Partanen J, Palotie A, Alitalo K, Alitalo R (1997) Analysis of Tie receptor tyrosine kinase in haemopoietic progenitor and leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 98:195
39. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285:1553
40. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013
41. Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR (1993) Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene* 8:663
42. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1579
43. Batard P, Sansilvestri P, Scheinecker C, Knapp W, Debili N, Vainchenker W, Bühring H-J, Monier M-N, Kukk E, Partanen J, Matikainen M-T, Alitalo R, Hatzfeld J, Alitalo K (1996) The Tie receptor tyrosine kinase is expressed by human hematopoietic progenitor cells and by a subset of megakaryocytic cells. *Blood* 87:2212
44. Haylock DN, Horsfall MJ, Dowse TL, Ramshaw HS, Niutta S, Protosaltis S, Peng L, Burrell C, Rappold I, Bühring H-J, Simmons PJ (1997) Increased recruitment of hematopoietic progenitor cells underlies the ex vivo expansion potential of FLT3 ligand. *Blood* 90:2260

45. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. P.N.A.S. (U.S.A.) 92:12240
46. He H, Naquet P, Caillol D, Pierres M (1991) Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca²⁺ independent mechanism. J. Exp. Med. 173:515
- 5 47. Zannettino AC, Buhning HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ (1998) The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis. Blood 15:2613
48. Doyonnas R, Yi-Hsin Chan J, Butler LH, Rappold I, Lee-Prudhoe JE, Zannettino AC, Simmons PJ, Buhning HJ, Levesque JP, Watt SM (2000). CD164 monoclonal antibodies that block hemopoietic progenitor cell adhesion and
10 proliferation interact with the first mucin domain of the CD164 receptor. J Immunol. 15:840

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un citoblasto que comprende las etapas de:
 - 5 proporcionar una muestra de células que incluye citoblastos; detectar la presencia de enzima convertora de angiotensina (ACE) o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE en una célula; detectar la presencia de al menos un marcador específico de citoblastos seleccionado del grupo que incluye STRO-1, SH2, SH3, SH4, citoqueratina 14, alfa-6 integrina (CD49F) y c-kit; y que es indicativo de ACE
 - 10 identificar los citoblastos que tienen ACE o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE y el marcador específico de citoblastos.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la ACE se detecta por la presencia de un péptido que tiene la secuencia LfqELQPLYL (SEC ID N°: 1).
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la ACE se detecta por la presencia de un péptido que tiene la secuencia EADFFTS (SEC ID N°: 2).
4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la ACE se detecta por la presencia de un péptido que tiene la secuencia de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2.
- 20 5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el citoblasto es un citoblasto hematopoyético.
- 25 6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección de ACE se realiza usando un anticuerpo para ACE o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE.
7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es anticuerpo BB9.
- 30 8. Un procedimiento para obtener una población de células enriquecida en citoblastos que comprende las etapas de
 - proporcionar una población de células que comprende citoblastos; y
 - seleccionar células que se identifican por la presencia de ACE o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE
 - 35 y al menos un marcador específico de citoblastos seleccionado del grupo que incluye STRO-1, SH2, SH3, SH4, citoqueratina 14, alfa-6 integrina (CD49F) y c-kit sobre la célula.
- 40 9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la ACE se detecta por la presencia de un péptido que tiene la secuencia de SEC ID N°: 1 y/o SEC ID N°: 2.
10. Un procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que las células se seleccionan por un anticuerpo para ACE o un fragmento de la misma que es indicativo de ACE.
- 45 11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo es BB9.
12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que los citoblastos son citoblastos hematopoyéticos.
13. Una población de citoblastos enriquecida preparada mediante los procedimientos según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.
- 50 14. Un uso de una población de citoblastos según la reivindicación 13 para la preparación de una composición para el tratamiento de una afección asociada a hematopoyética en un paciente.
- 55 15. Una población de citoblastos según la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de una afección asociada a hematopoyética en un paciente.

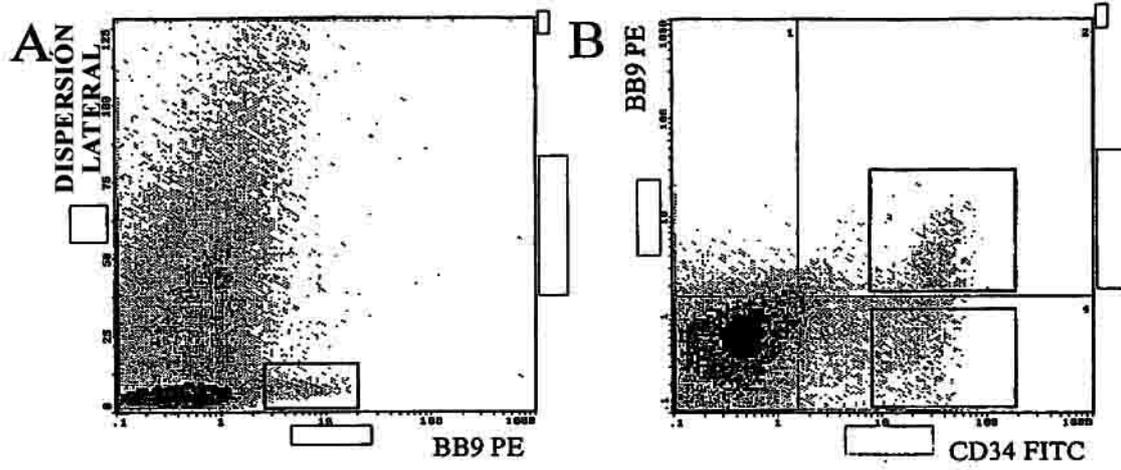


Figura 1

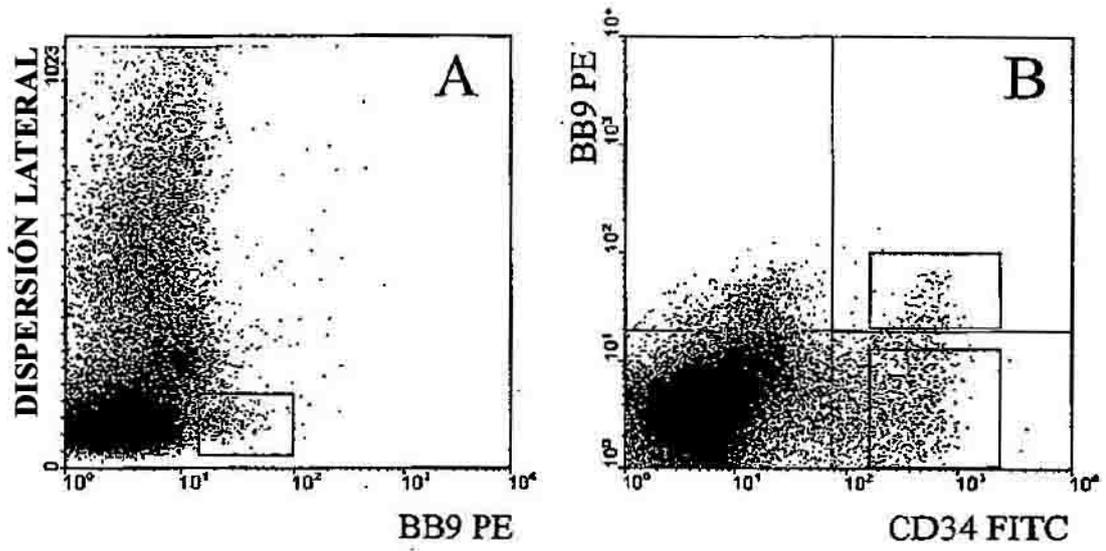


Figura 2

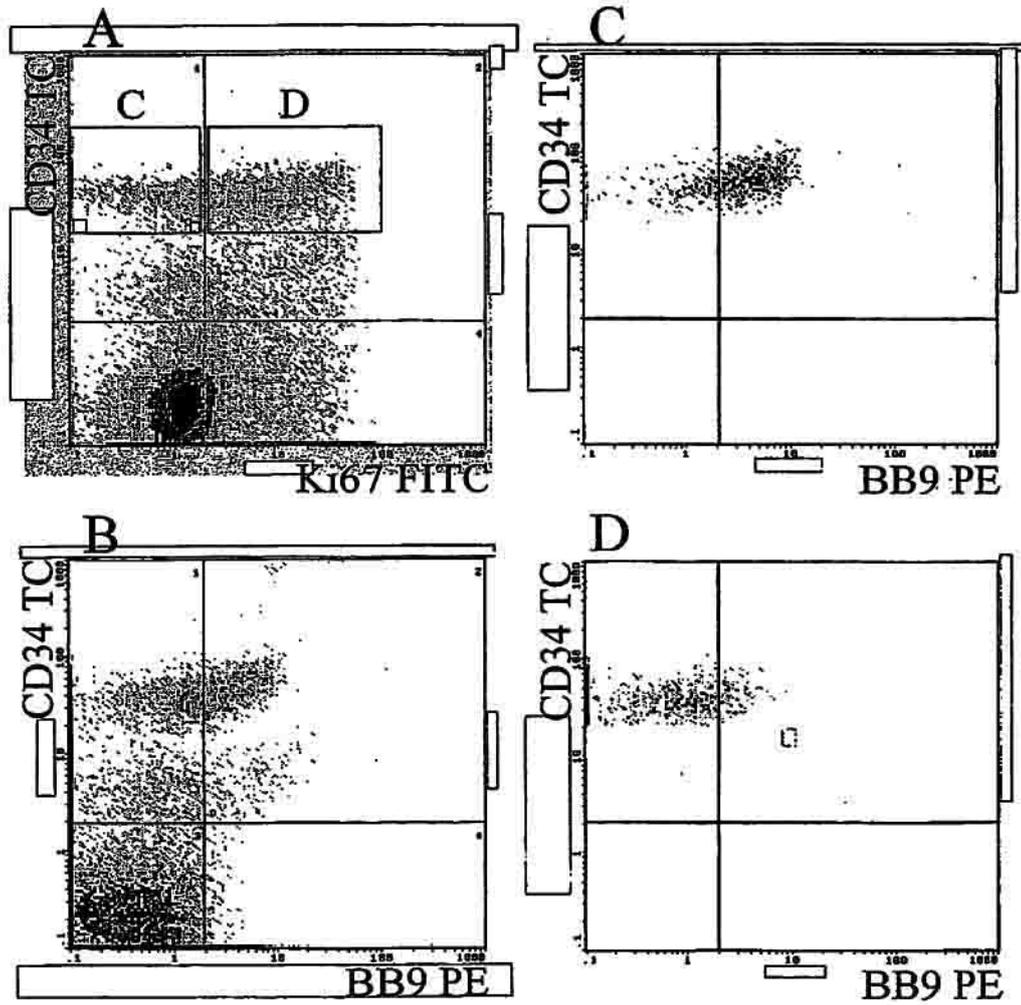


Figura 3(a)

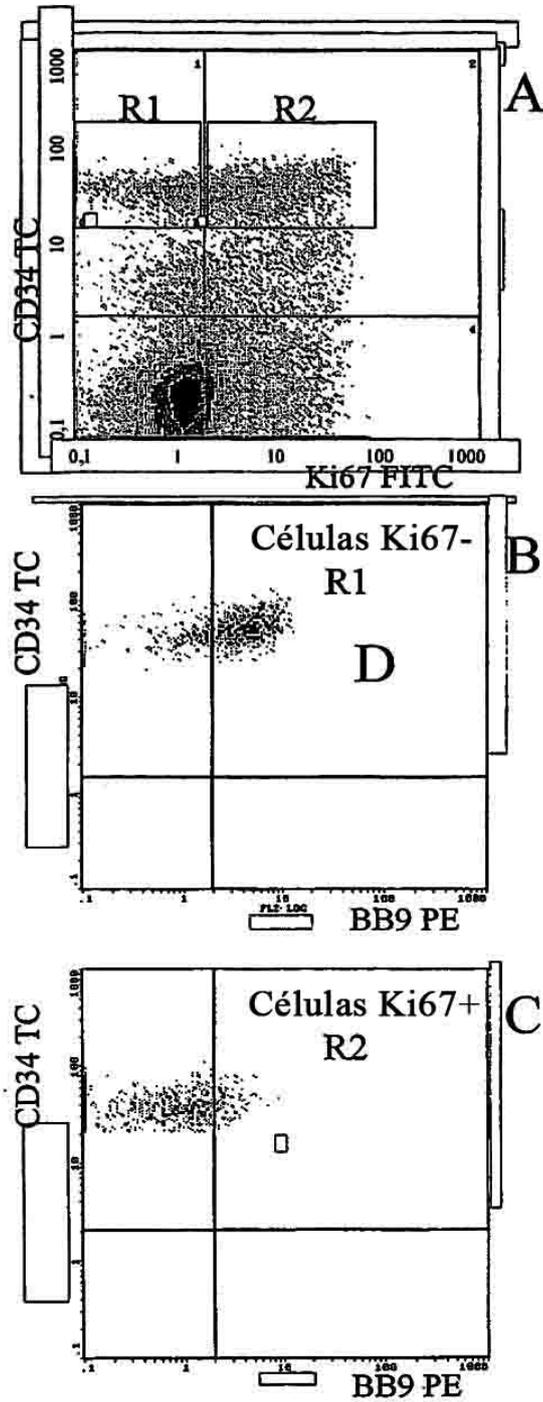


Figura 3(b)

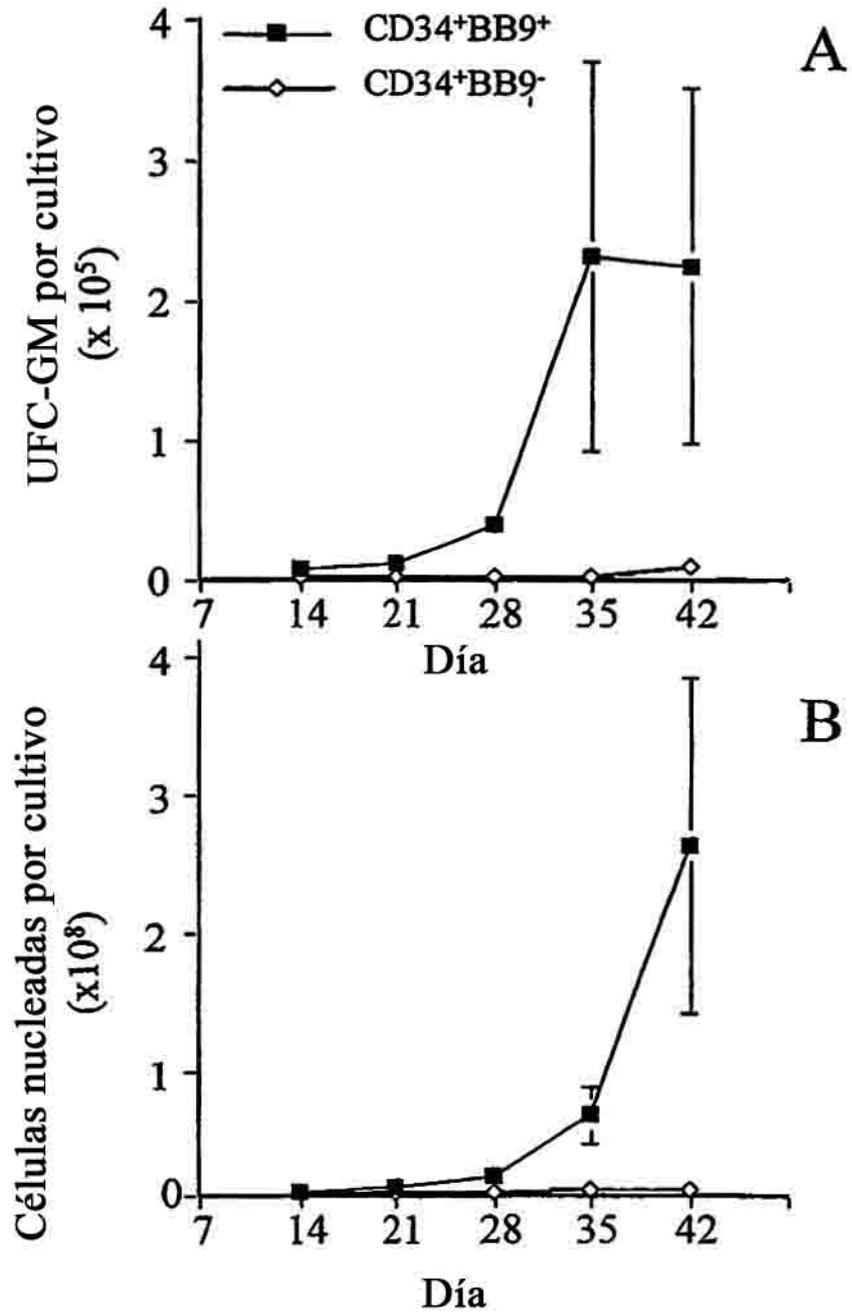


Figura 4

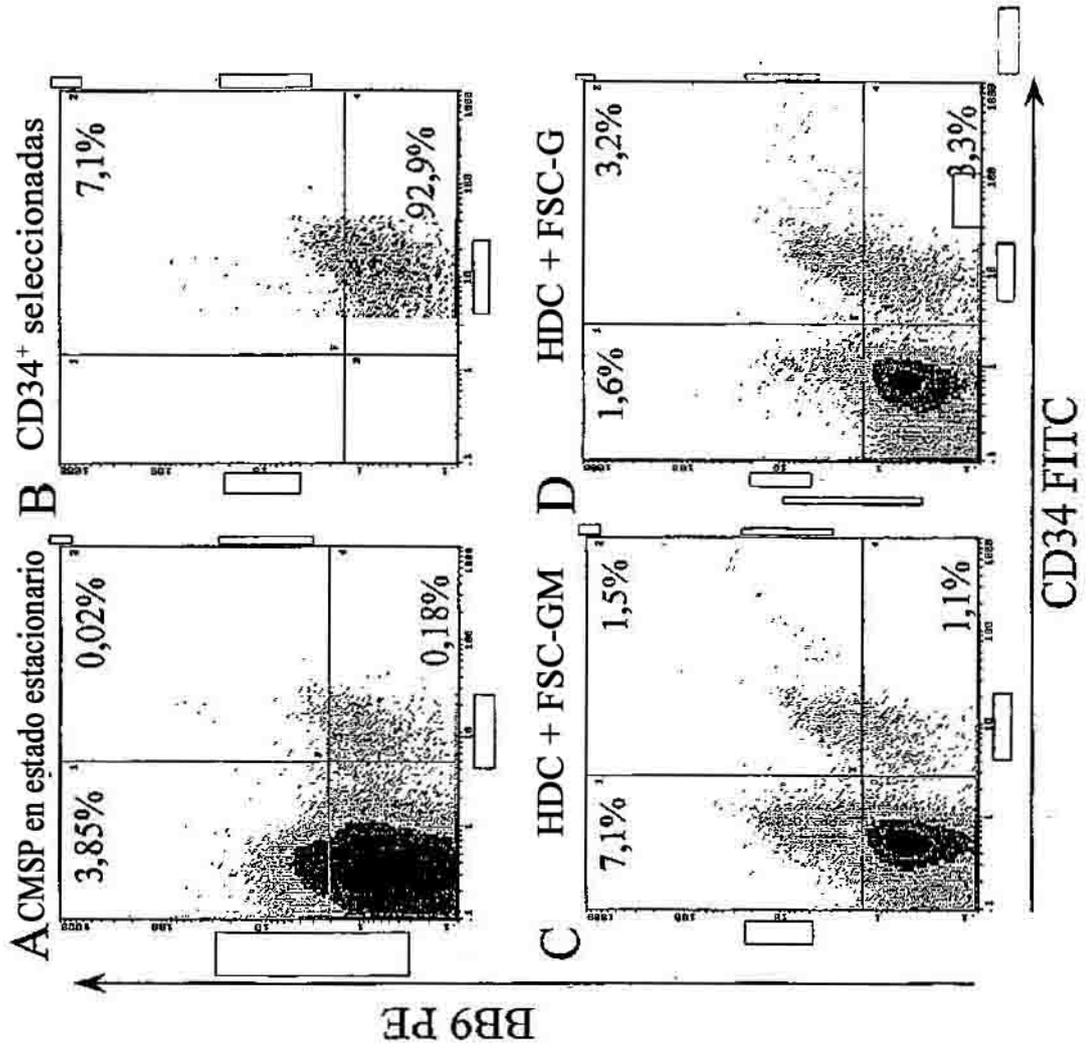


Figura 5

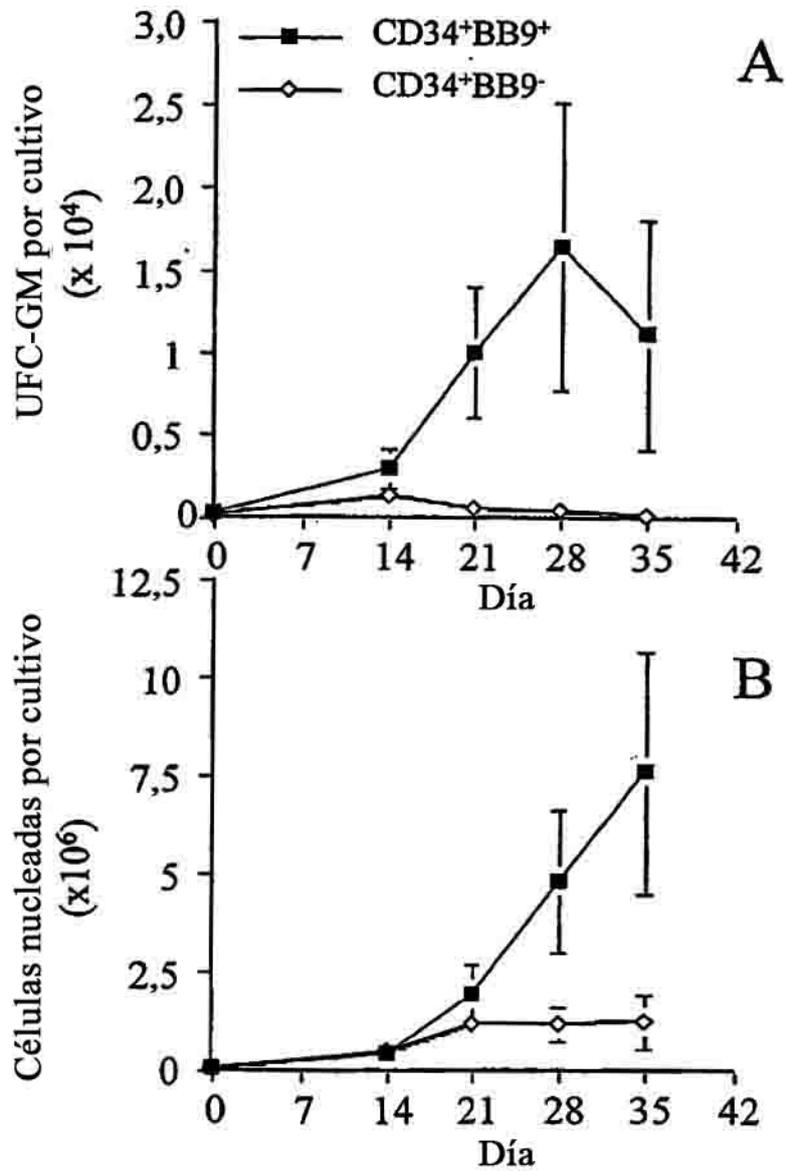


Figura 6

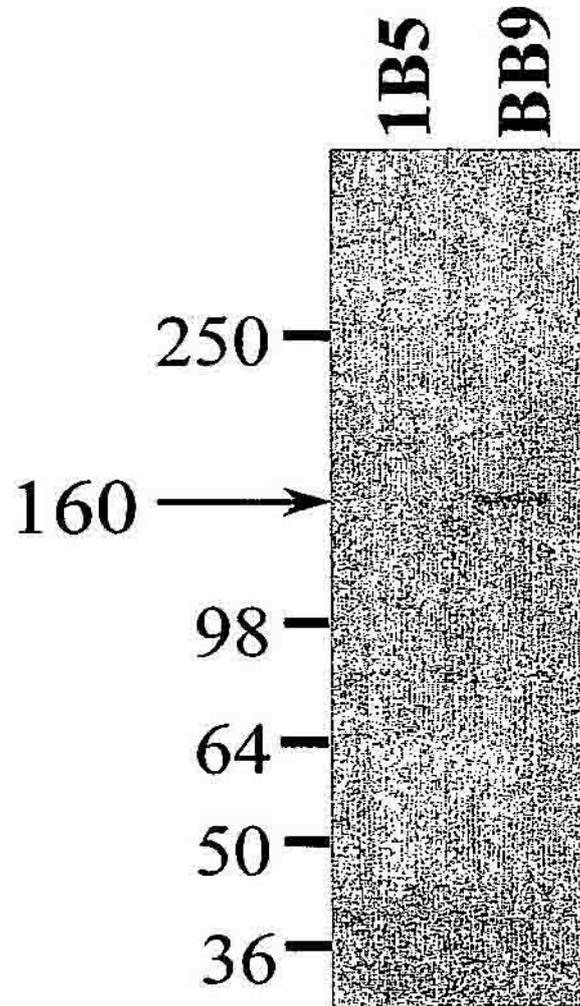


Figura 7

Células CD34+BB9+ que injertan funcionalmente ratones NOD/SCID

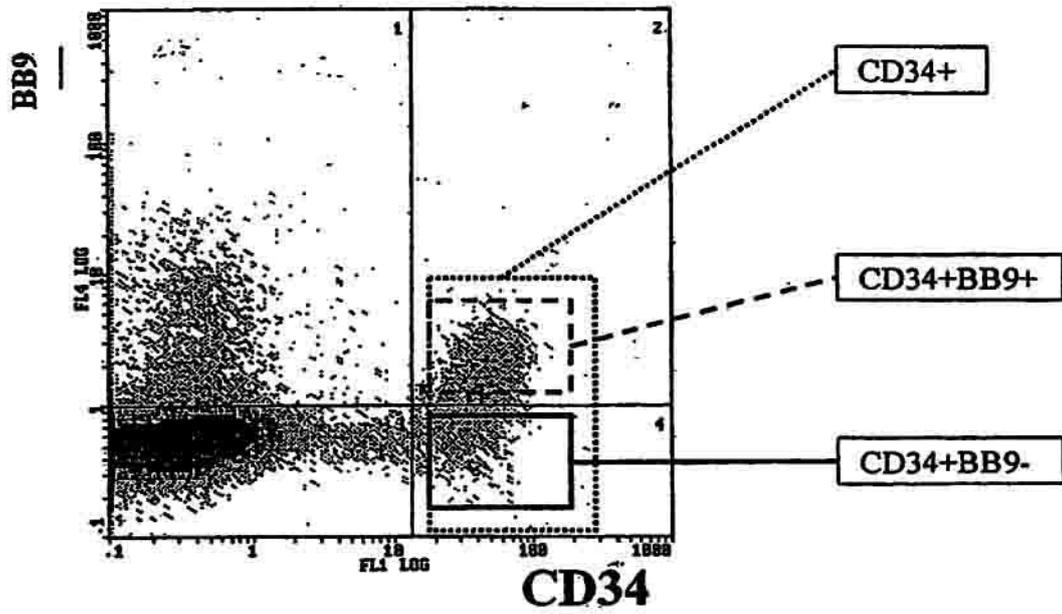


Figura 8