

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 311**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/07** (2010.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04010723 .7**  
96 Fecha de presentación: **05.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1593737**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **Uso de anticuerpos anti glicoproteína ACA para obtener/mantener células madre pluripotentes no embrionarias**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.08.2012**

73 Titular/es:  
**Becker-Kojic, Zorica  
Johann-Casimir-Weg 4  
69181 Leimen, DE**

72 Inventor/es:  
**Becker-Kojic, Zorica**

74 Agente/Representante:  
**No consta**

ES 2 386 311 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

Uso de anticuerpos anti glicoproteína ACA para obtener/mantener células madre pluripotentes no embrionarias.

5 La presente invención se refiere al uso de una glicoproteína ACA o un activador de ACA anclado a glicosilfosfatidil inositol (GPI) para obtener células madre pluripotentes no embrionarias o para mantener el fenotipo pluripotente de células madre no embrionarias.

10 Las células madre embrionarias (ES) son el arquetipo de célula madre, capaces de diferenciarse para formar el espectro completo de las diferentes células que se encuentran en el organismo adulto. Las mencionadas células se describen como pluripotentes ya que son capaces de diferenciarse en muchos tipos celulares. Aunque las ES han sido aisladas de tejidos embrionarios humanos, su uso en Investigación y con fines terapéuticos está restringido debido a consideraciones éticas. Las células madre también existen en la mayoría de los tejidos adultos incluyéndose células madre del tejido hematopoyético, neural, gastrointestinal, epidérmico, hepático y mesenquimal. Sin embargo, estas células madre tienen menor capacidad de auto-renovación y una capacidad más restringida para la diferenciación, es decir no son pluripotentes.

20 Hasta hace poco, se pensaba que las células madre específicas de tejido podían diferenciarse únicamente en células del tejido de origen. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las células madre específicas de tejido pueden diferenciarse a linajes diferentes del tejido de origen. Después del trasplante de médula ósea o de células madre hematopoyéticas (HSC) enriquecidas, se han detectado células del donante, como mioblastos óseos, mioblastos cardíacos, endotelio, hepático y del epitelio del conducto biliar, pulmón, Intestinos y tejido epitelial, así como células del neuroectodermo. Algunos estudios han demostrado que las células madre neurales así como células musculares pueden diferenciarse a células hematopoyéticas. Cuando estas células son inyectadas en el blastocisto, las células madre neurales contribuyen a la formación de diferentes tejidos del embrión quimérico de ratón. Sin embargo, los estudios llevados a cabo hasta ahora no han podido demostrar definitivamente que las células madre específicas de tejido se puedan diferenciar a células funcionales de diferentes tejidos, y por tanto ser pluripotentes. En resumen, aunque hay una gran necesidad de generar células madre humanas no embrionarias pluripotentes (células madre adultas), todavía no se han solucionado los problemas asociados al cultivo estable a largo plazo para la propagación de estas células madre, incluyendo el problema de la falta de pluripotencia.

30 Así pues, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar las bases para obtener y mantener células madre no embrionarias pluripotentes.

35 La solución al mencionado problema técnico se ha alcanzado proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Sorprendentemente, se ha encontrado que la activación de ACA, una glicoproteína de superficie anclada a GPI, es suficiente para mantener el fenotipo pluripotente de las células madre hematopoyéticas humanas. ACA es una glicoproteína de membrana de 65 kD con una excepcional estructura diacilglicerol de anclaje lipídico específica para fosfatidilinositol y sensible a fosfolipasa C (PI-PLC) sensible a diacilglicerol de anclaje lipídico, aislado previamente de eritrocitos humanos (Becker-Kojlc' and Terness, J. Biol. Chem. 2002; 277:40472-40478; EP-A1 1 391-463). En los estudios que dieron como resultado la presente invención se generaron anticuerpos policlonales de conejo, así como monoclonales de ratón para la proteína purificada y que se emplearon para realizar estudios de expresión de la proteína ACA en células de sangre periférica mediante citometría de flujo en uno o dos colores. Los resultados mostraron que esta proteína está presente en granulocitos, monocitos, linfocitos B pero no en Células T. De forma aún más importante, un subconjunto de células madre o progenitoras de médula ósea CD34+/CD38- también alberga ACA.

50 Está claro que en células proliferativas, especialmente aquellas de origen maligno, ACA induce potentes señales necesarias para la proliferación celular. Esta propiedad funcional está en línea con la estructura bioquímica de anclaje, la cual inserta ACA en la membrana celular. Los derivados glicerolípidicos de ACA, resultantes de la hidrólisis con fosfolipasas endógenas e o D tales como inositolglicanos, diacilglicerol, fosfolípidos y ácido fosfatídico, son intermedos bien conocidos en los eventos de señalización de membrana y activan la cascada de segundos mensajeros intracelulares. Se ha proporcionado fuerte evidencia en los últimos años de las "balsas lipídicas", que son plataformas organizacionales basadas en lípidos que contienen proteínas unidas a GPI, tirosina kinasas y lípidos en la membrana de células vivas, y que juegan un papel relevante en muchos procesos celulares. El entrecruzamiento de algunas proteínas unidas a GPI induce la regulación cadena arriba de proteínas de superficie asociadas a la activación y producción de citoquinas que promueven el crecimiento celular.

60 Los experimentos ilustrados más abajo esclarecen la(s) putativa(s) nueva(s) vía(s) de transducción de señal específicas(s) para ACA involucrada en el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación de las células madre humanas hematopoyéticas. Las células madre humanas hematopoyéticas (=HSC) se caracterizan por la doble capacidad de auto-renovarse y de diferenciarse en progenitores de múltiples células sanguíneas. Estas dos características requieren que las HSC experimenten divisiones asimétricas para generar células que mantengan una larga hematopoyesis por un lado, así como una variedad de células hijas con diferentes linajes sanguíneos, por otro lado. Las células CD34+/CD38- que se dividen asimétricamente dan lugar a más colonias que las CD34+/CD38+

que muestran división simétrica. De forma remarcable, después de una ligación de ACA a la membrana celular inducida por anticuerpo, la población de células progenitoras CD34+/CD38+ evoluciona hacia células divididas asimétricamente, indicando claramente la competencia de la proteína ACA en la señalización. Células mononucleares aisladas de células de cordón umbilical después de la ligación del anticuerpo a ACA dan lugar a una concentración mucho más alta de células madre hematopoyéticas y por tanto indica que éste podría ser un nuevo método para conseguir una población de células madre útil para la práctica clínica.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Datos de análisis representativos de la expresión de ACA en poblaciones de células madre que fueron separadas en base a la expresión de CD34+/CD38+ y CD34+/CD38-. (A) Control de isotipo, (B) Expresión de ACA en células CD34+/CD38+ y CD34+/CD38-.

Figura 2: Imágenes de inmunofluorescencia de células CD34+/CD38+ teñidas con anticuerpos monoclonales para la glicoproteína ACA humana.

Figura 3: Imágenes de inmunofluorescencia de células CD34+/CD38- teñidas con anticuerpos monoclonales específicos anti ACA.

Figura 4: Imágenes de inmunofluorescencia de células CD34+/CD38+ antes de, y 24 horas después de, el entrecruzamiento con anticuerpos monoclonales para ACA.

Así, la presente invención está relacionada con el uso de anticuerpo anti-glicoproteína ACA anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), para obtener células madre pluripotentes no embrionarias, para mantener el fenotipo pluripotente de células madre no embrionarias o para expandir células madre pluripotentes no embrionarias *ex vivo*, de tal manera que la diferenciación de dichas células se minimice o impida.

Tal como se usa aquí, el término "célula madre no embrionaria" comprende cualquier célula madre no embrionaria, por ejemplo una célula madre de gónadas o célula madre/progenitoras somática, tal como célula madre hematopoyética, célula madre epidérmica, célula madre mesenquimal o célula madre neural, prefiriéndose una célula madre hematopoyética. Las fuentes para obtener y/o propagar versiones pluripotentes de las mencionadas células son por ejemplo médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, tejido graso, hígado, músculo, mioblastos esqueléticos, mioblastos cardíacos, endotelio y epitelio.

Tal como se usa aquí, el término "glicoproteína ACA anclada a glicosilfosfatidilinositos (GPI)", se refiere a la proteína natural descrita en Becker-Kojic' and Terness, J. Biol. Chem. 2002; 277:40472-40478; EP-A1 1 391-463.

Tal como se usa aquí, el término "que la diferenciación de las mencionadas células se minimiza o impide", se refiere a las condiciones de cultivo en las que las células madre mantienen el estado de pluripotencia que tenían antes de expandirse.

Las células madre pueden ponerse en contacto con una glicoproteína ACA anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) mediante diferentes métodos, por ejemplo (a), cultivando las células en un medio que contenga las mencionadas proteínas, (b), transfectando las células con un vector, expresando intracelularmente la mencionada proteína en forma secretable, o (c), co-cultivando las células con células productoras que expresen la mencionada proteína de fusión de forma que se pueda secretar. Cualquier experto técnico en la materia conoce métodos adecuados para la transfección y vectores adecuados, véase por ejemplo DE 196 08 813 C2. El experto técnico en la materia puede decidir qué aproximación es la más adecuada.

El experto técnico en la materia también conoce los métodos adecuados para cultivar células madre en medios adecuados. El medio basal que contiene una proteína de la invención puede ser cualquier medio que se usa generalmente para el cultivo de células de mamífero (humanas); véase por ejemplo: DE 196 08 813 C2, EP-B1 0 695 351. En una realización preferida, el medio basal es IMEM (Life Technologies, Karlsruhe, Germany) o Cellgro (Cellgenix, Freiburg, Germany). El experto técnico en la materia puede determinar la concentración óptima de la glicoproteína ACA anclada en glicosilfosfatidilinositol (GPI) mediante simple experimentación; véase ver también DE 196 08 813 C2. Preferentemente, la concentración de la glicoproteína ACA anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) está en el rango de 5 a 100 ng/ml de medio.

EL GPI-ACA usado como aditivo en un medio, puede prepararse según protocolos estándar. Preferentemente, la proteína se produce por recombinación o puede ser purificada a partir de fuentes naturales, como se describe por ejemplo en Becker-Kojic' y Terness, 2002. El término "anticuerpo", preferentemente se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en una mezcla de anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades epitópicas, así como diferentes preparaciones de anticuerpos monoclonales. Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpos monoclonales" (Mab), pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos (como por ejemplo los fragmentos, Fab y F (ab')<sub>2</sub>), que son capaces de unirse específicamente a ACA. Los fragmentos

Fab y F (ab') 2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan de la circulación más rápidamente y pueden tener una menor cantidad de unión no específica de tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1 983)). Por lo tanto, estos fragmentos son preferidos, así como los productos de una librería de expresión de FAB o de otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos anti-ACA incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

La GPI-ACA puede usarse directamente o como un aditivo a un medio. Puede también incorporarse a las células madre mediante expresión intracelular y posterior secreción. Para la expresión intracelular se puede emplear cualquier vector capaz de replicarse en las células de mamífero, preferentemente un vector de expresión. Preferentemente, la secuencia de DNA que codifica la proteína ACA está unida operativamente a un promotor adecuado. El experto técnico en la materia conoce vectores de expresión adecuados. Algunos vectores recombinantes preferidos son vectores virales, por ejemplo adenovirus, virus del herpes, vaccinia o más preferentemente un virus de RNA como por ejemplo retrovirus. Aún más preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus de ratón o ave. Algunos ejemplos de estos vectores retrovirales que pueden ser usados en la presente invención son el virus Moloney de leucemia de ratón (MoMuLV), o el virus de sarcoma de Harvey de ratón (HaMuSV), el virus de tumor mamario de ratón (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Además también se prefieren lentivirus, tales como HIV o SIV.

La construcción de los vectores recombinantes pueden llevarse a cabo según métodos convencionales (cf. Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA). Estos vectores incluirán preferentemente al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para el cultivo en células eucariotas o resistencia a tetraciclinas, kanamicinas o ampicilinas para el cultivo en *E.coli* u otras bacterias. Algunos ejemplos representativos de huéspedes adecuados para la amplificación de dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas como por ejemplo *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*, células fúngicas tales como levaduras, células de insectos como por ejemplo células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, células de animales y células de plantas.

La introducción de los vectores arriba mencionados dentro de las células madre hematopoyéticas CD34+/CD38+ se puede realizar usando métodos bien conocidos, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, nucleofección, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio.

Las células madre hematopoyéticas (HSC) se definen como células con capacidad de auto-renovación ilimitada así como de diferenciación multilineal en progenitores de todos los linajes celulares sanguíneos maduros. Este descubrimiento marcó el principio de la investigación moderna en células madre. Se ha sugerido que el signo distintivo de una célula madre podría ser su capacidad de dividirse asimétricamente para producir una célula idéntica a la madre, y otra célula comprometida para diferenciación (Yeh and Lily, 1998, Nature 392:775). Estas dos características requieren que las HSC experimenten rondas de divisiones asimétricas para generar tanto células maduras de los distintos linajes sanguíneos como células que sostengan la hematopoyesis a largo plazo. Una pregunta fundamental en la biología del desarrollo es cómo las células madre se dividen de forma auto-renovadora asimétrica, y cómo una única célula puede dividirse para dar lugar a dos células hijas que adoptan destinos diferentes. Es posible que dos células hijas de una misma HSC sean inicialmente equivalentes pero que las posteriores divisiones den como resultado diferentes destinos de la progenie. Las células hijas podrían diferenciarse a través de una posterior exposición a una señal ambiental, es decir, debido a factores extrínsecos. En los experimentos que se describen más abajo se ha descubierto que el potencial proliferativo para la capacidad de auto-renovación de una célula madre hematopoyética puede distribuirse mediante la transferencia de una proteína ACA desde la célula madre a través del contacto con una de las hijas.

Las células madre hematopoyéticas CD34+/CD38+ son HSC, preferiblemente HSC humanas.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1.

## **Análisis de la expresión de ACA en diferentes líneas celulares**

### **(A) Introducción**

Los dominios lipídicos tienen funciones excepcionales en la clasificación de proteínas y lípidos de membrana y su transporte a sitios intracelulares específicos. Algunos estudios bioquímicos que involucran extracción en frío en detergentes no iónicos, seguida de flotación en un gradiente de densidad de sucrosa, muestran que kinasas y muchas otras proteínas de señalización se concentran en la fracción de membrana insoluble a detergentes de baja densidad que está enriquecida en glicolípidos y colesterol. Estas estructuras se han denominado de muchas formas, incluyendo membranas resistentes a detergentes (DRMs) o dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergentes (DIGs). Se cree que derivan de balsas lipídicas en la membrana plasmática: dominios enriquecidos en

colesterol y esfingolípidos con menor fluidez que el grueso de la membrana, que forman la denominada fase líquida ordenada (Simons and Ikonen, 1996, Nature 387:569-572).

5 Estas estructuras se forman espontáneamente debido a que las largas colas de ácidos grasos saturados hidrofóbicos de los esfingolípidos tienden a asociarse y empaquetarse con colesterol. Los fosfolípidos con cadenas acílicas saturadas también tienden a incluirse en las balsas, pero en la mayoría de las células, la mayor parte de los fosfolípidos de la membrana plasmática tienen grupos acilo insaturados y forman un volumen de fase más fluida. Estas estructuras son altamente dinámicas, porque los lípidos son sus principales componentes estructurales y tienen una velocidad intrínsecamente alta de movimiento lateral dentro de la bicapa. Su comportamiento dinámico  
10 los hace idealmente adecuados para responder rápidamente a cambios en la fisiología celular. Muchas proteínas transmembranas quedan excluidas de las balsas lipídicas, aunque algunas se incluyen en ellas; los motivos de estas diferencias se desconoce en gran parte. Sin embargo, las proteínas que se encuentran más comúnmente en las balsas lipídicas llevan una o más modificaciones lipídicas, como acilación o anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI); los grupos acilo saturados favorecen el empaquetamiento en una fase líquida ordenada. Muchas de estas proteínas están implicadas en señalización y así las balsas lipídicas son frecuentemente usadas por las células como  
15 plataformas supra-moleculares para coordinar y potenciar los procesos de señalización.

Las rutas de transducción de señales son elementos modulares de series de proteínas funcionalmente interdependientes que actúan de forma coordinada para transformar la información ambiental en una respuesta fenotípica. Muchas glicoproteínas de superficie ancladas a membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) son únicas en cuanto a que penetran únicamente la parte exterior de la membrana plasmática pero continúan siendo capaces de mediar eventos de señalización intracelular tras la ligación inducida por anticuerpos. Participan en la regulación del crecimiento y diferenciación celular y se ha mostrado que están asociadas de forma no covalente con proteínas tirosina kinasas, reguladores clave de la activación celular y transducción de señales (Stefanova *et al.*, 1991, Science 254:1016-1019). Estas proteínas de membrana denominadas de tipo III están por tanto desprovistas de cualquier dominio intracelular que pudiera unir las a moléculas cito plasmáticas de transducción de señales. La unión de ligandos o anticuerpos naturales a algunas proteínas unidas a GPI induce la activación celular. Algunas de las actividades biológicas de las moléculas GPI pueden ser reguladas por productos de la ruptura proteolítica o lipolítica. Estos metabolitos proporcionan una fuente potencialmente abundante de mensajeros secundarios farmacológicamente activos, incluyendo inositol fosfoglicanos, inositol péptidoglicanos y diglicéridos.  
20  
25  
30

Actualmente, el fenotipo de las HSC humanas y progenitores no está completamente definido. La mayoría de los estudios sugieren que las HSC humanas son células quiescentes pequeñas que expresan la glicoproteína de superficie CD34. Datos de muchos laboratorios e investigaciones clínicas indican que las células CD34+ comprenden aproximadamente un 1% de las células mononucleares de la médula ósea humana (BM), incluyendo las células progenitoras de todos los linajes y células madre linfohematopoyéticas, pero generan el repertorio completo del sistema linfohematopoyético y son los homólogos normales de las células anormales en las leucemias mieloides, mielodisplasias y anemias aplásicas. Debido a que las células madre son un tipo celular importante, pero escaso dentro de la población de células CD34+, los investigadores han subdividido la población de células CD34+ para enriquecer aún más las células madre. El subgrupo de células CD34+/CD38- comprende menos del 10% de las células BM de adulto CD34+ (<0.1% de las células mononucleares de la médula ósea); carece de expresión de marcadores dedicados al linaje celular (lin), contiene células con capacidad de repoblación *in vitro*, y se predice que está altamente enriquecido en células madre. Estas células purificadas a partir de médula utilizando microesferas inmunomagnéticas o clasificación celular activada por fluorescencia generaron hematopoyesis humana multilínea a largo plazo de una forma fácilmente detectable en el modelo *in vivo* en oveja fetal. Por el contrario, la transferencia de células CD34+/CD38+ a una oveja fetal pre-inmune generó hematopoyesis humana solamente a corto plazo, sugiriendo que la población celular CD34+/CD38+ contiene células progenitoras hematopoyéticas multipotentes relativamente tempranas pero no células madre (Curt *et al.*, 1996, Blood 88:4102-4109). En resumen, la población de células CD34+/CD38- tiene una alta capacidad para los injertos hematopoyéticos multilínea a largo plazo, y así  
35  
40  
45  
50 pues se predice que esta población celular está altamente enriquecida en células madre.

El objetivo de los presentes experimentos fue elucidar la expresión y importancia funcional de la glicoproteína humana ACA en las células madre hematopoyéticas humanas.

## 55 (B) Resultados

### Materiales y Métodos

60 Células mono nucleares sanguíneas aisladas a partir de sangre de cordón umbilical y sangre periférica movilizada se enriquecieron en células CD34+ usando microesferas inmunomagnéticas o separación por clasificación celular activada por fluorescencia, y la expresión de ACA se analizó usando anticuerpos monoclonales específicos anti ACA.

(1) Análisis de la expresión de ACA en células madre/progenitoras hematopoyéticas humanas mediante FACS

Se aislaron células mononucleares a partir de sangre periférica movilizada (P. Mollee *et al.*, Bone Marrow Transplant, 2002, 30:273-278), se tiñeron con un anticuerpo marcado con CD34 APC y se aislaron las células CD34+ por clasificación celular activada por fluorescencia. Las células CD34+ obtenidas se tiñeron con un anticuerpo específico para CD38 PE y ACA y con un anticuerpo de cabra anti ratón Alexa Fluor 488 (Mo Bi Tec GMBH, Gö ttingen, Alemania) como anticuerpo secundario, y se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (Figura 1).

(2) Expresión de ACA en células CD34+/CD38+ (población de células progenitoras humanas)

Se aislaron células mononucleares a partir de sangre de cordón umbilical se, se incubaron con un anticuerpo anti CD34 marcado con APC, y las células CD34 positivas se separaron magnéticamente utilizando microesferas MACS anti-APC, tal como describe el fabricante (Miltenyi Biotec, Alemania). Después de teñir con un anticuerpo anti CD38 PE, las células CD34+/CD38+ se purificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia. Las células aisladas se sembraron en placas de cultivo con medio de cultivo RPMI conteniendo un 10% de FBS, se incubaron con un anticuerpo específico para ACA (EP 1 391 463 A1) y un anticuerpo de cabra anti ratón Alexa Fluor 488 como anticuerpo secundario. Se adquirieron imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido (Figura 2A). Las células madre/progenitoras mitóticas se cultivaron durante 24 horas de la forma descrita más arriba y después se fijaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% y, tras lavar, se incubaron con un anticuerpo anti-ACA marcado con antiratón Alexa Fluor 488 de cabra. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio de fluorescencia invertido. Las células madre/progenitoras mitóticas muestran el mayor grado de expresión de ACA (Figura 2B).

(3) Expresión de ACA en células CD34+/CD38- (población de células madre humanas)

Se aislaron células mononucleares a partir de sangre de cordón umbilical, se enriquecieron en células CD34+ como se ha descrito más arriba, se tiñeron con CD38- PE y las células CD34+/CD38- se purificaron entonces usando clasificación celular activada por fluorescencia. Las células aisladas se colocaron en medio de cultivo, se incubaron con anticuerpos específicos anti-ACA/anti-ratón Alexa Fluor 488 de cabra y se adquirieron imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido (Figura 3).

(4) Entrecruzamiento de las células CD34+/CD38+ con un anticuerpo específico para ACA

Se obtuvieron células CD34+/CD38+ de la forma descrita anteriormente, y se incubaron con un anticuerpo específico para ACA, se sembraron en placas de cultivo con el medio de cultivo apropiado y se adquirieron imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido antes, y 24 h después, de la incubación con el anticuerpo (Figura 4).

**(C) Conclusiones**

De los experimentos descritos más arriba se pueden extraer las siguientes conclusiones:

ACA se expresa en ambas poblaciones hematopoyéticas importantes, tanto en células madre (CD34+/38-) como en células progenitoras (CD34+/38+).

Se cree que las células CD34+/CD38+ representan una población de células progenitoras con células que se dividen simétricamente y que tienen una limitada (a corto plazo!) capacidad de hematopoyesis. Esta población consiste en células redondas, no polares, que se han acabado de diferenciar morfológicamente (no cambios posteriores en morfología!) y muestran una distribución uniforme de moléculas de superficie celular. Curiosamente, ACA se expresa en estas células en un micro-dominio específico en la membrana de estas células.

Las células CD34+/CD38- se dividen asimétricamente, tienen una alta capacidad para el injerto hematopoyético multilínaje a largo plazo, y se cree que están altamente enriquecidas en células madre. En estas células, ACA se expresa exclusivamente en una parte polar de la célula (huso!) y de forma constante en el micro-dominio de la membrana donde las células madre presentan contacto entre ellas.

El entrecruzamiento (ligación) de las células CD34+/CD38+ con un anticuerpo específico para ACA conduce a una completa transformación de esta población celular. Las células, redondas y no polares, se convierten en 24h en células que se dividen asimétricamente, con una expresión típica "*de novo*" de la proteína ACA, lo cual claramente indica la competencia de esta proteína en señalización. La implicación de ACA promueve la agregación de balsas lipídicas, lo cual facilita la co-localización de proteínas de señalización, potenciando de esta manera la fosforilación de la proteína tirosina y la subsiguiente activación de proteínas transductoras de señales y de proteínas que activan la transcripción. De forma aún más importante, la estimulación directa de ACA con su correspondiente anticuerpo es suficiente para mantener las HSC en un estado indiferenciado (pluripotente), y conduce a la expansión masiva de células madre hematopoyéticas "*in vitro*".

En su conjunto, estos datos sugieren que la proteína ACA es una molécula clave en el importante proceso celular que mantiene el fenotipo pluripotente de las células madre hematopoyéticas, y que puede ser aprovechado en la práctica clínica sin ninguna de las consideraciones éticas que acompañan a las células madre embrionarias.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para obtener o mantener células madre pluripotentes no embrionarias, que comprende poner en contacto células hematopoyéticas CD34+/CD38+ que tienen la glicoproteína ACA anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) con un anticuerpo anti GPI-ACA.
2. Método según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo anti GPI-ACA es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, donde las células son de médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, tejido graso, hígado, músculo, mioblastos esqueléticos, mioblastos cardiacos, endotelio o epitelio.

A

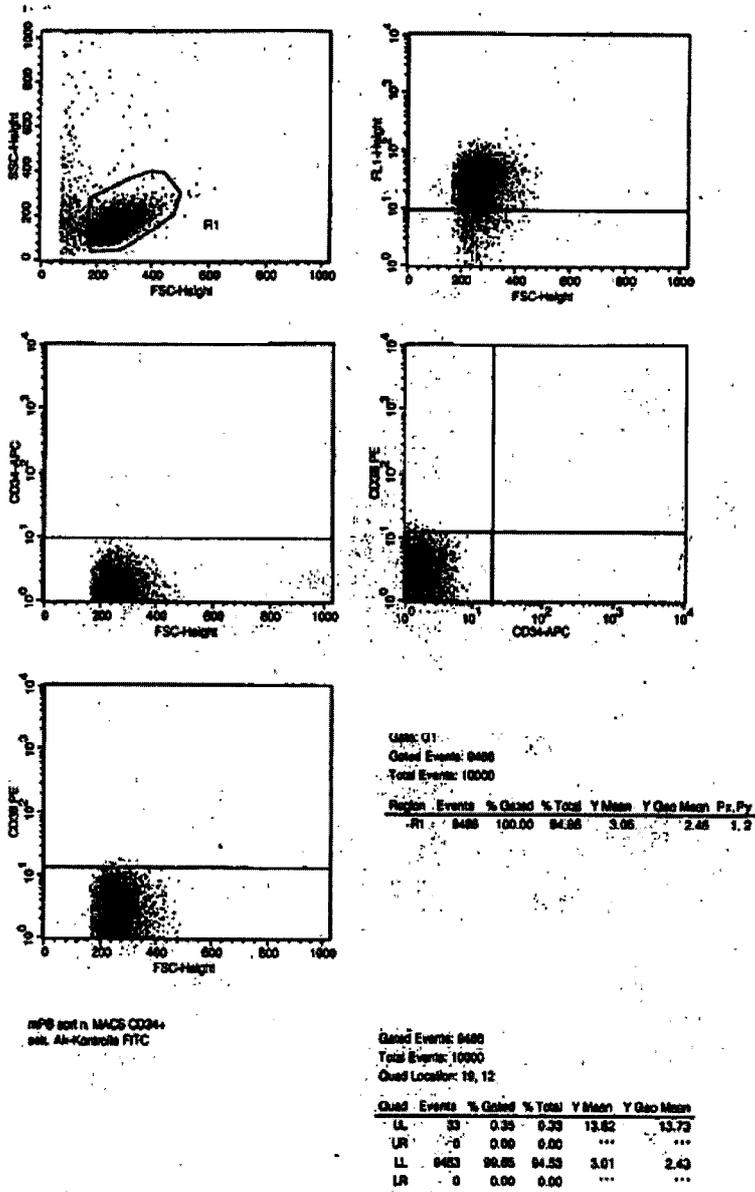


Fig. 1A

**B**

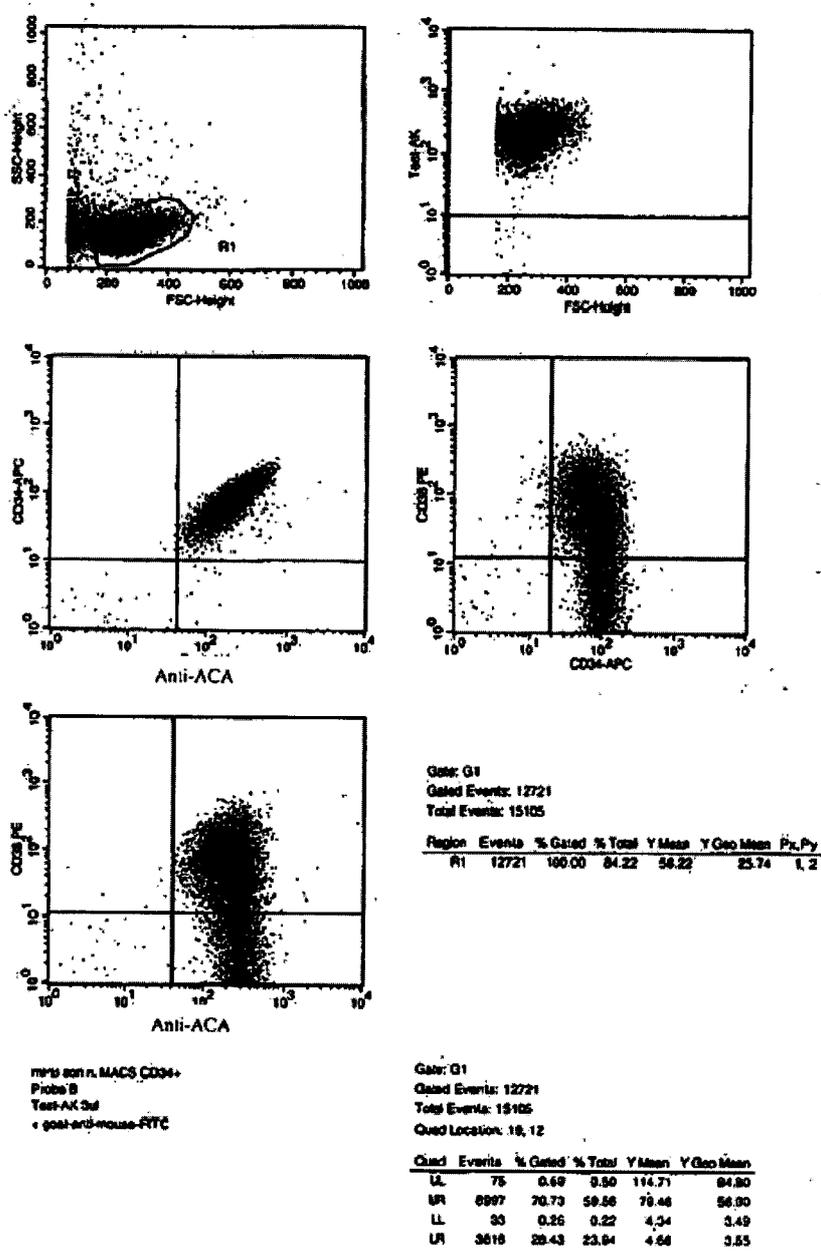
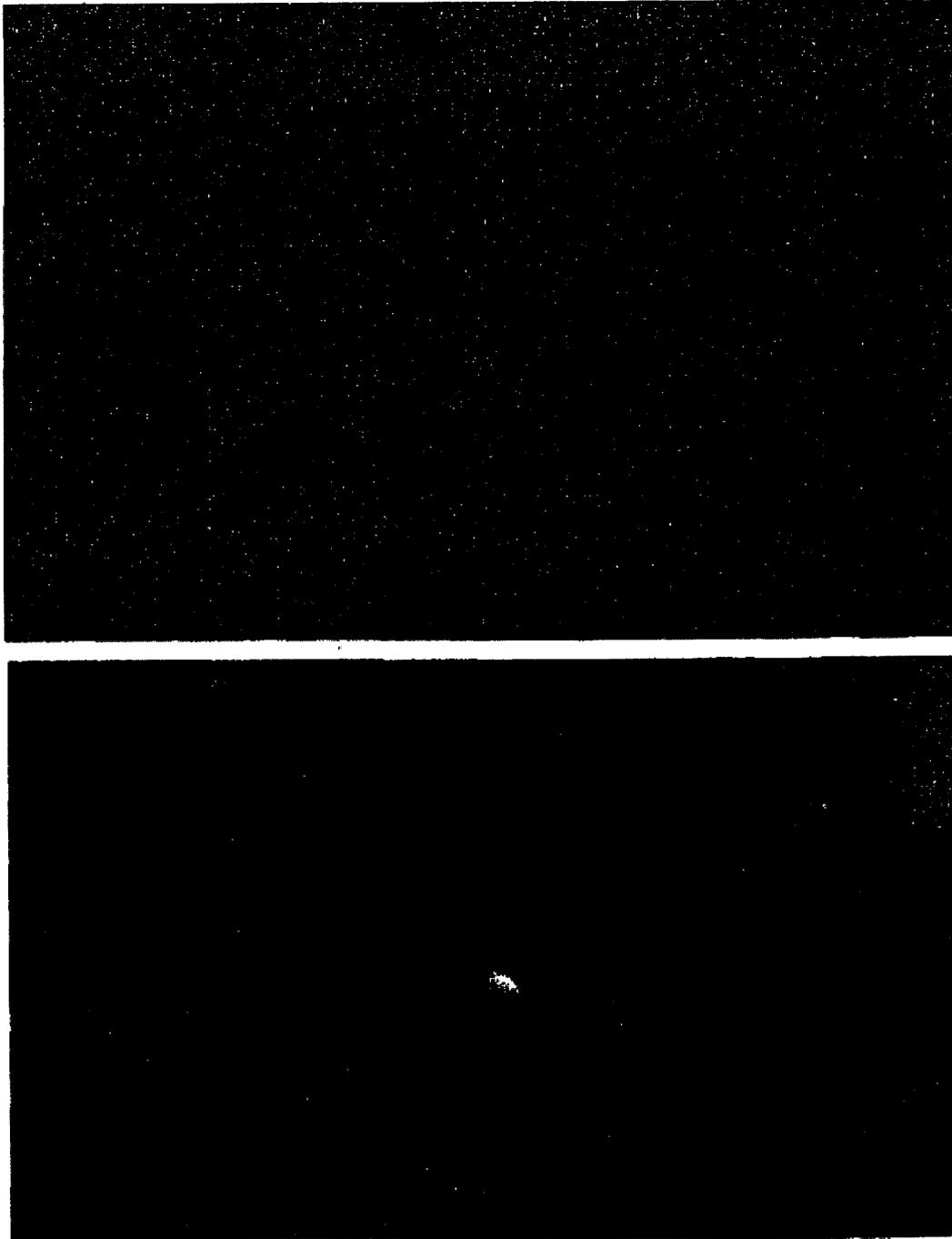


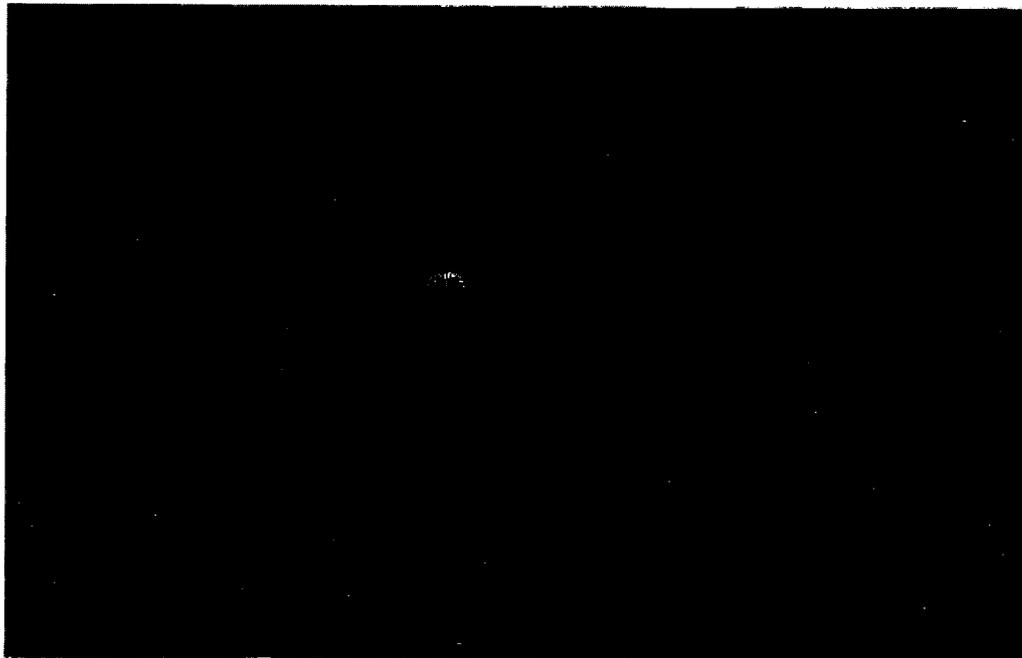
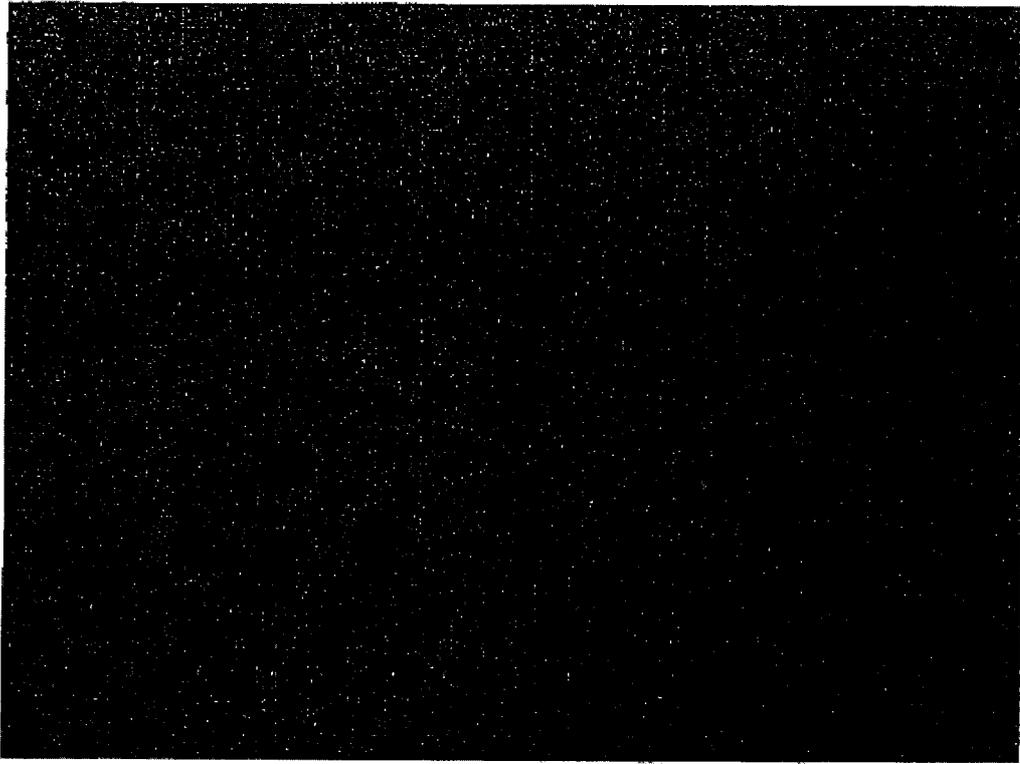
Fig. 1B

**Fig. 2A(a)** Células CD34+ / CD 38+



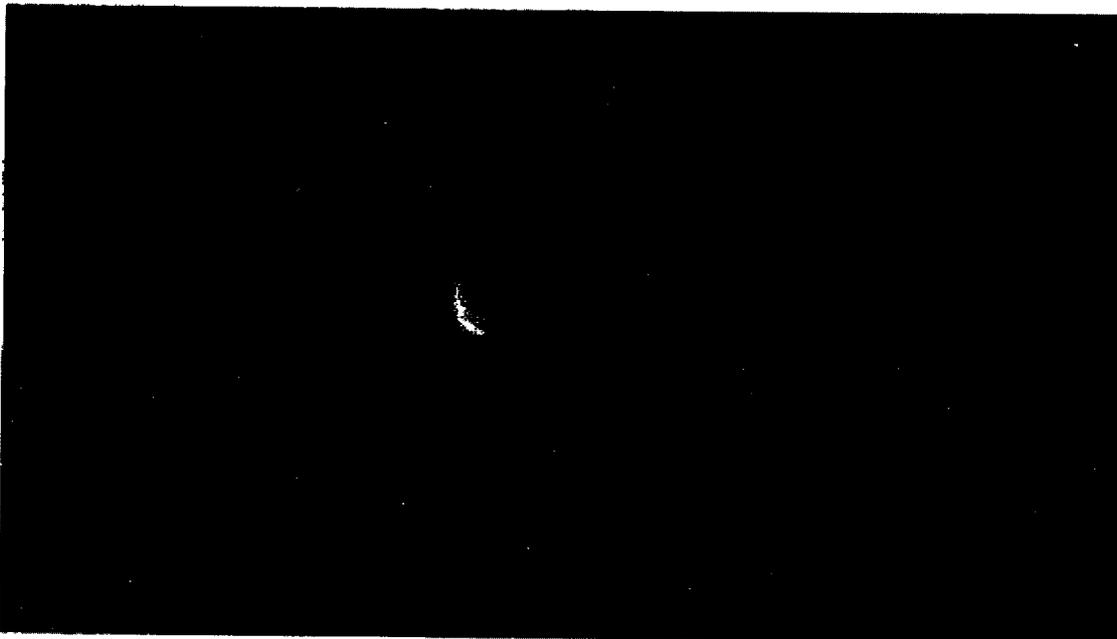
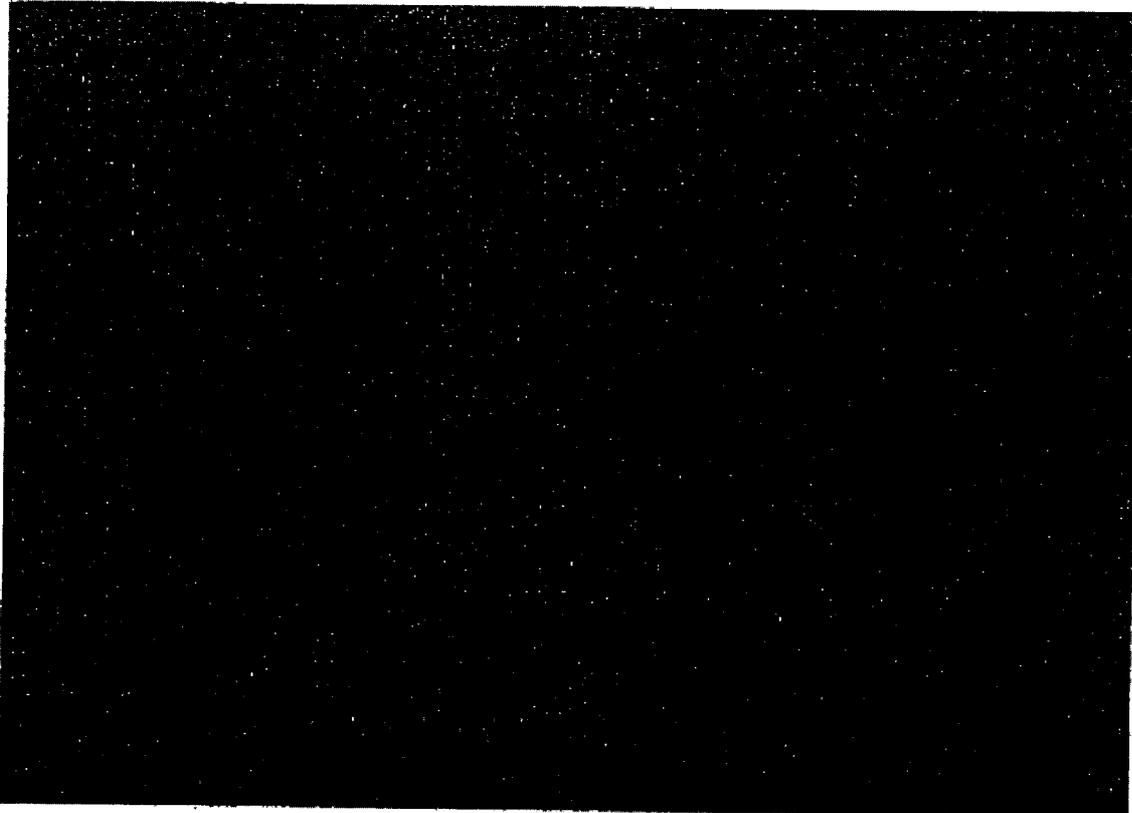
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2A(b)** Células CD34+ / CD 38+



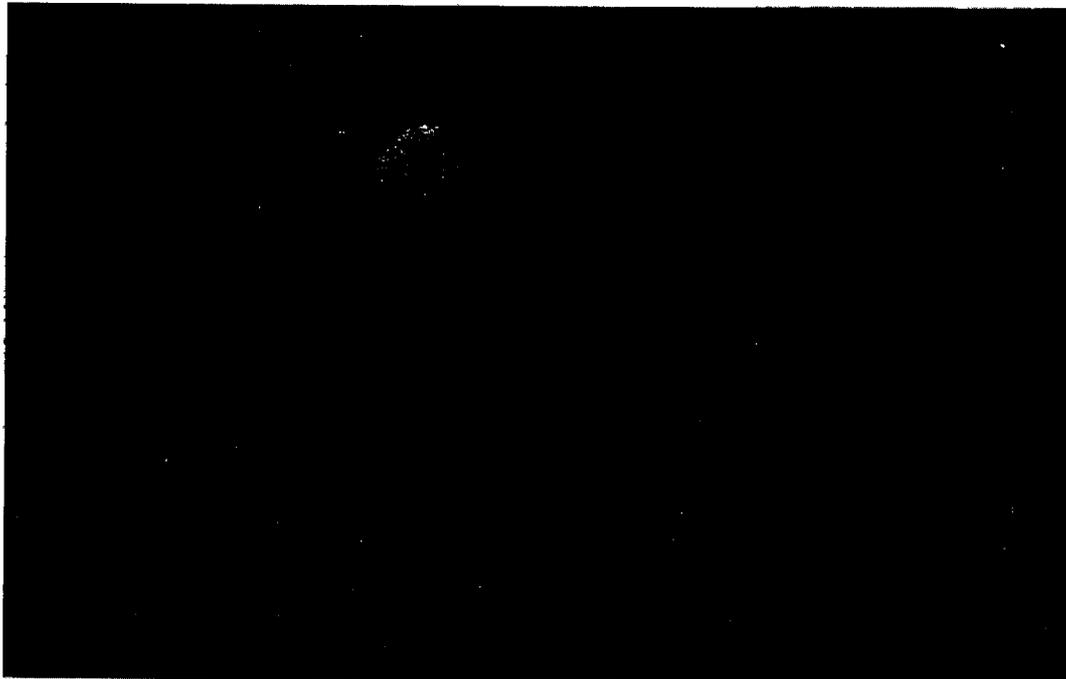
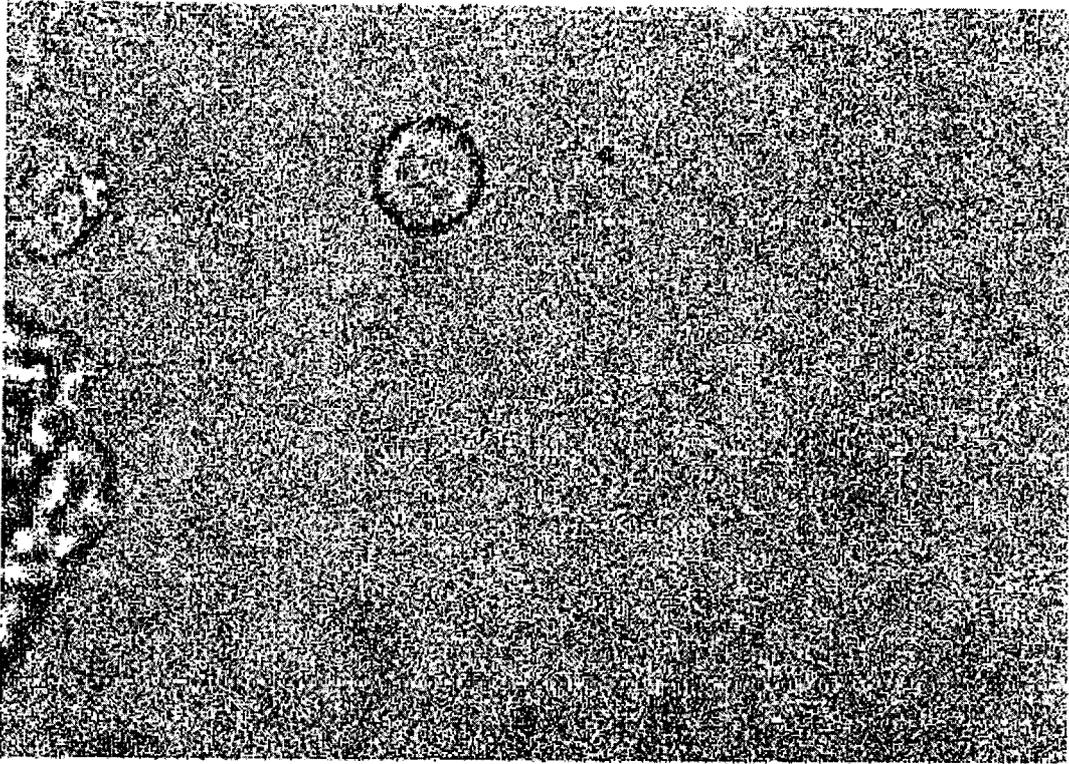
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2A(c)** Células CD34+ / CD 38+



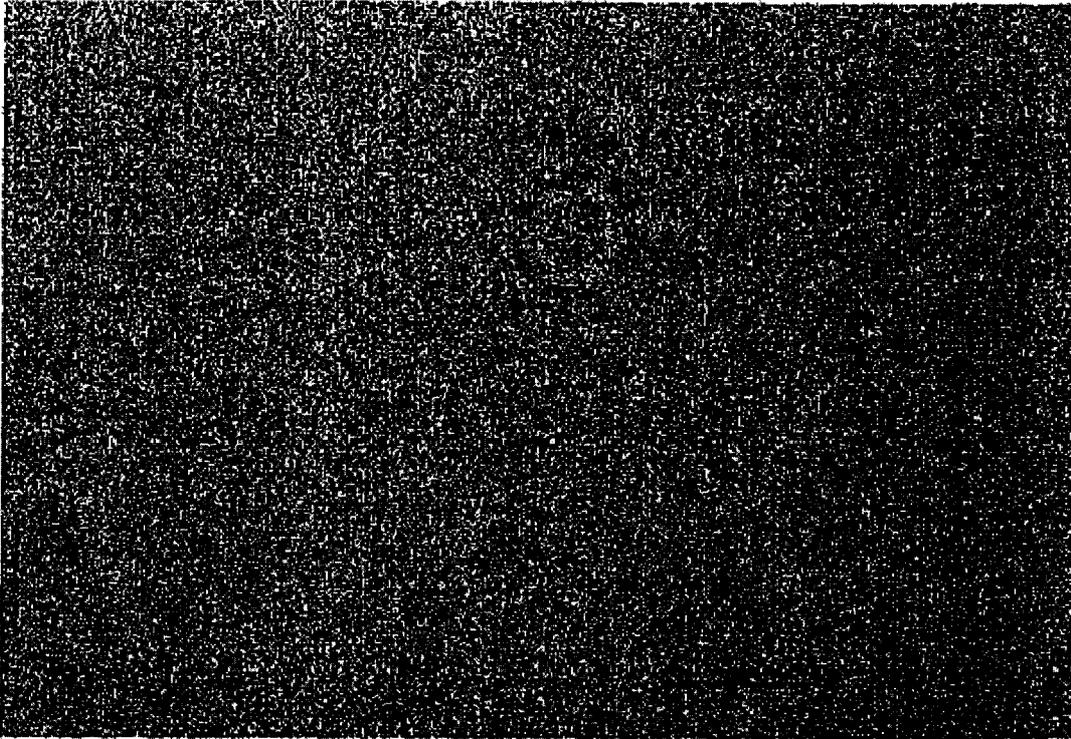
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2A(d)** Células CD34+ / CD 38+



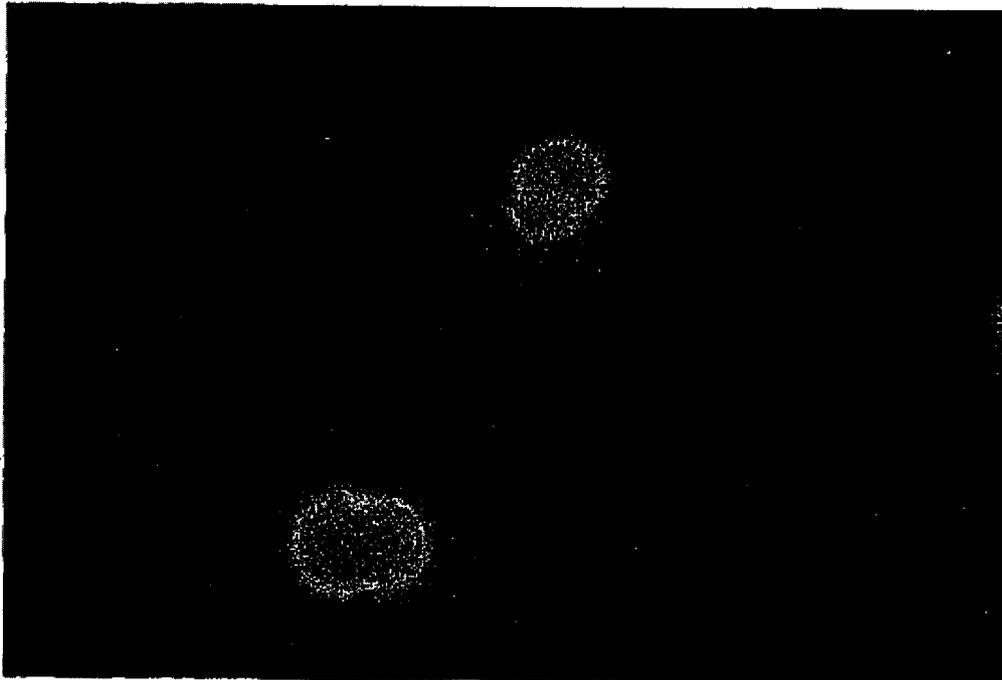
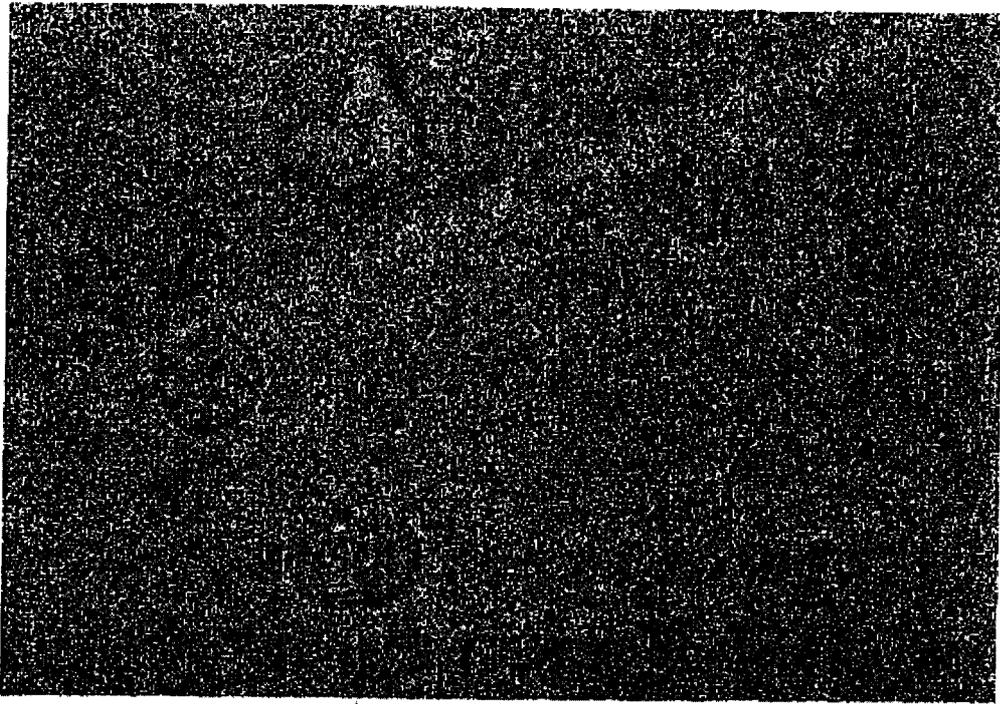
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2A(e)** Células CD34+ / CD 38+



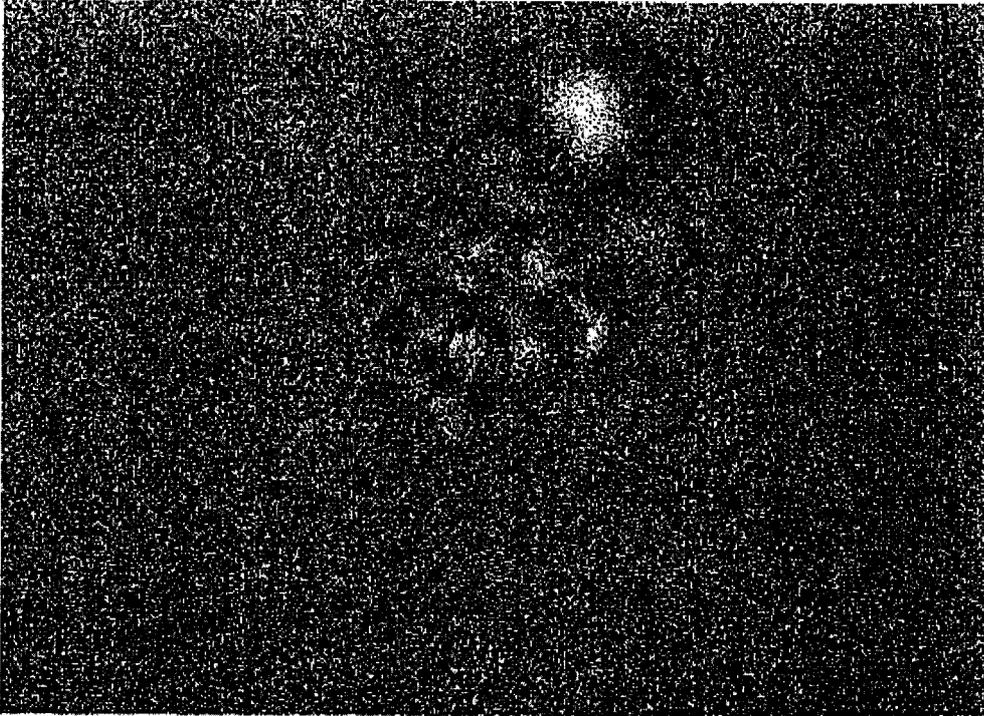
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2B(a)** Células CD34<sup>+</sup> / CD 38<sup>+</sup>



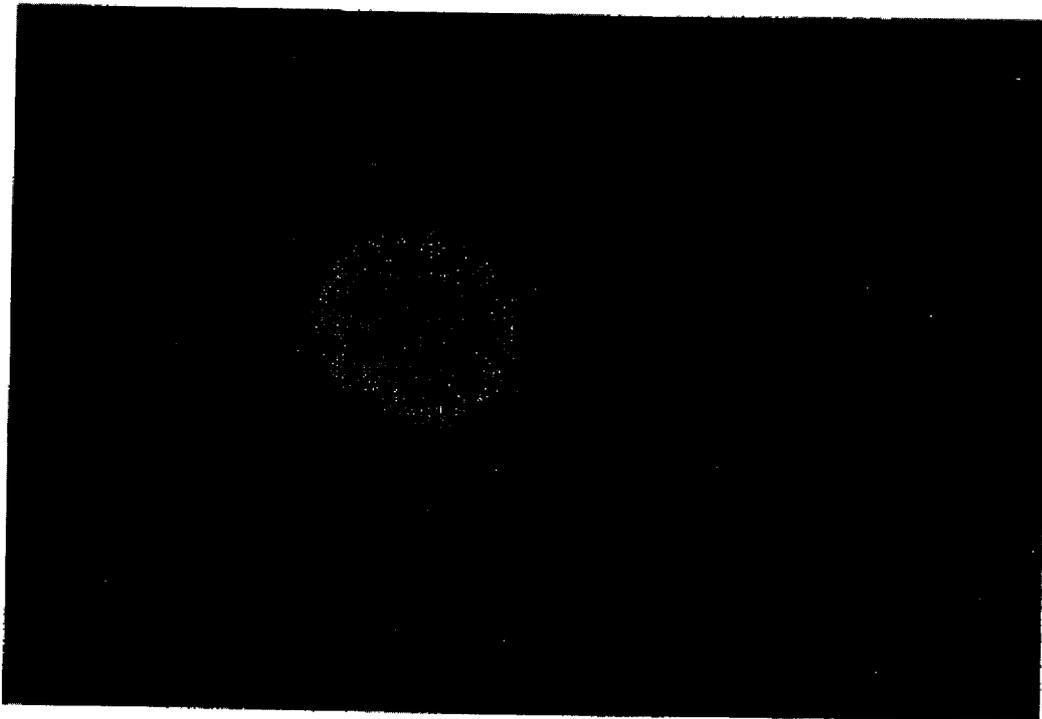
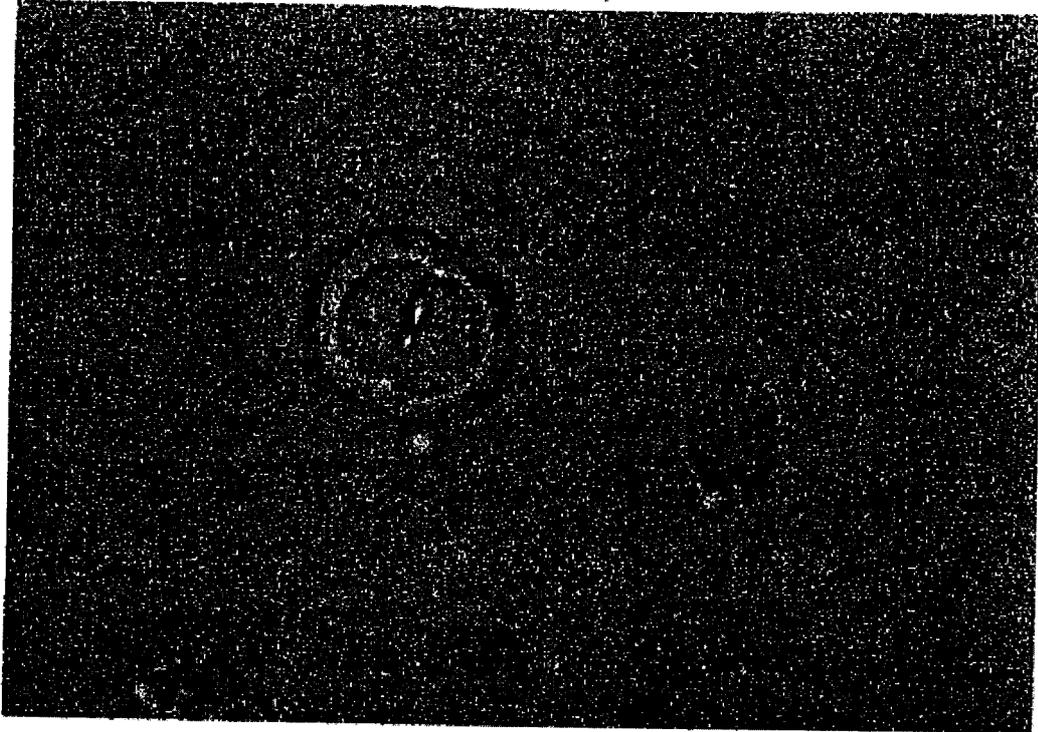
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>+</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2B(b)** Células CD34+ / CD 38+



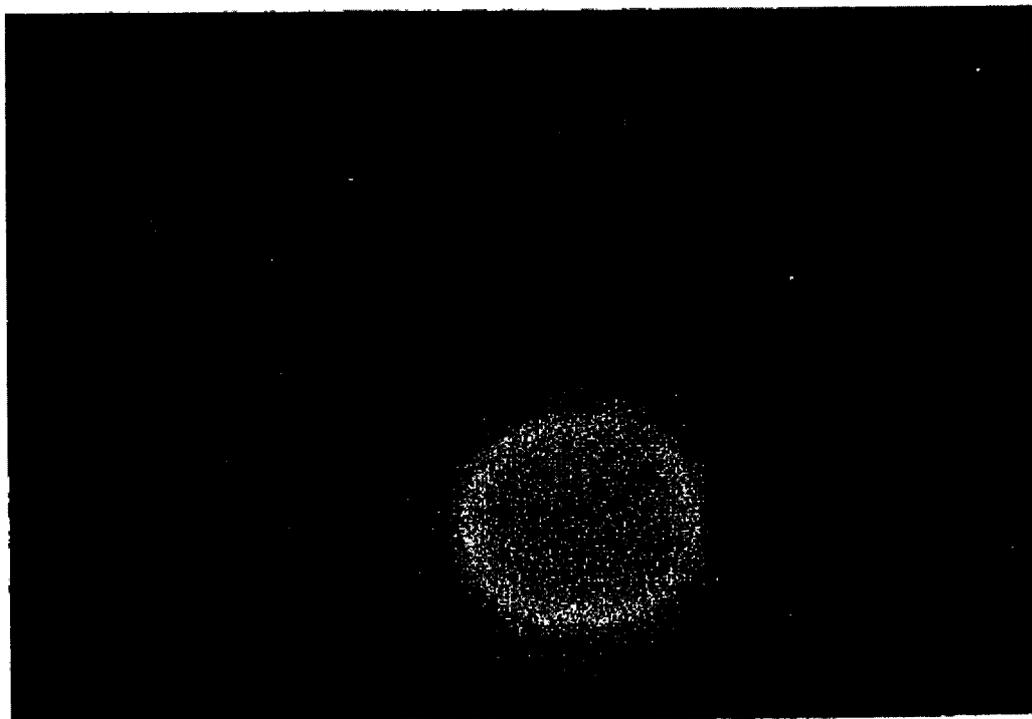
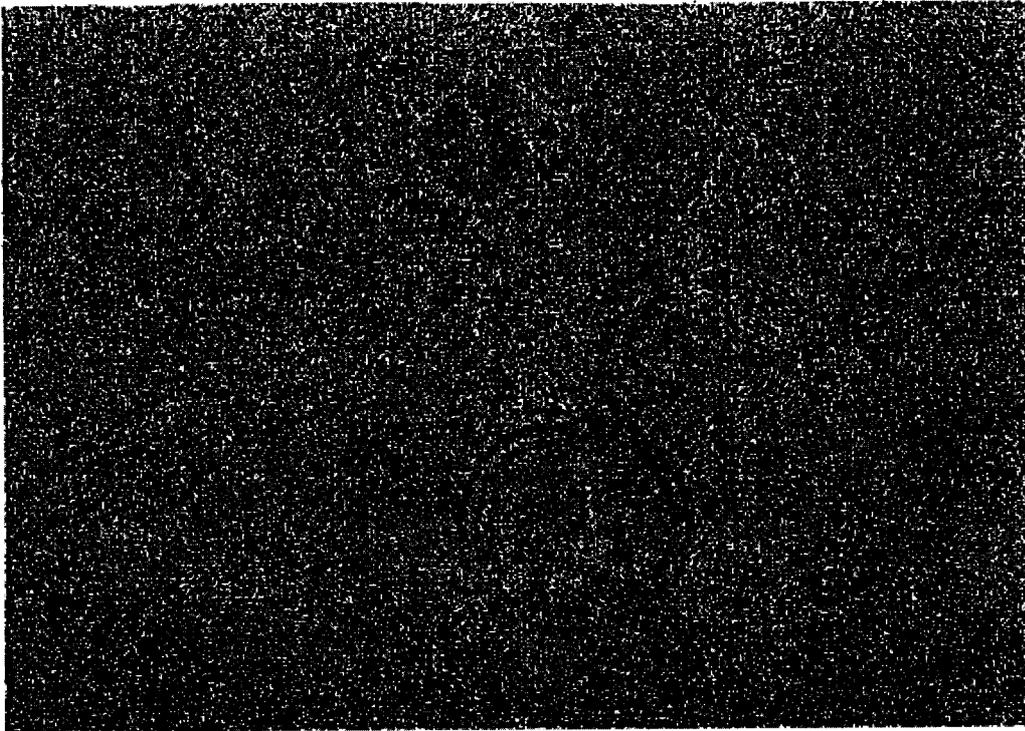
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2B(c)** Células CD34+ / CD 38+



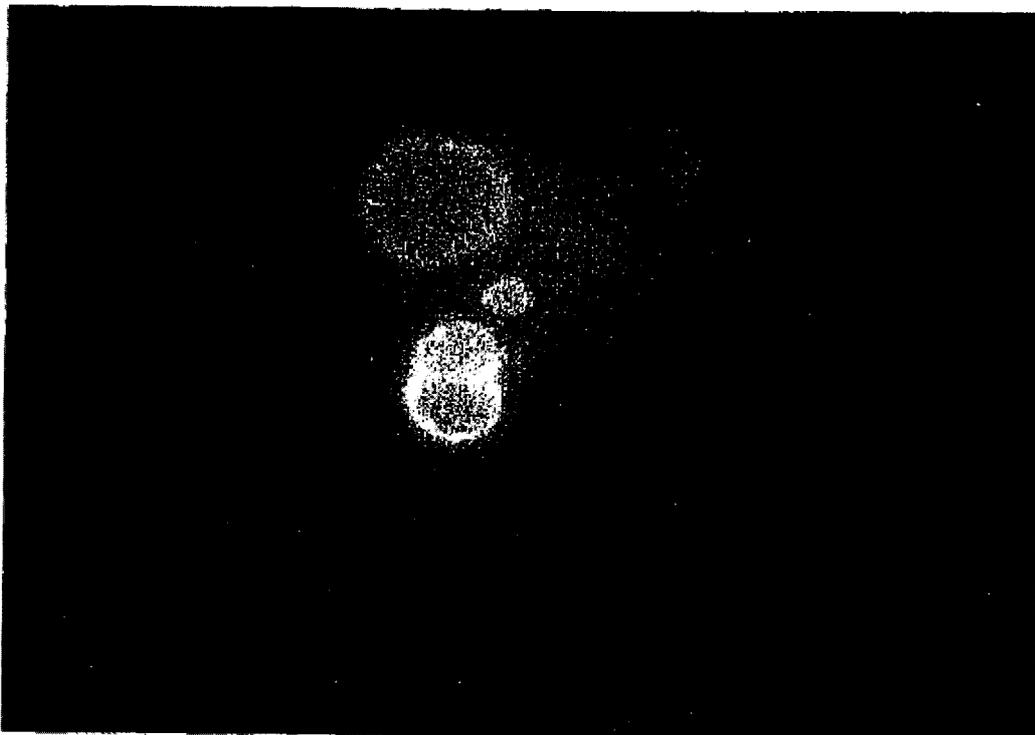
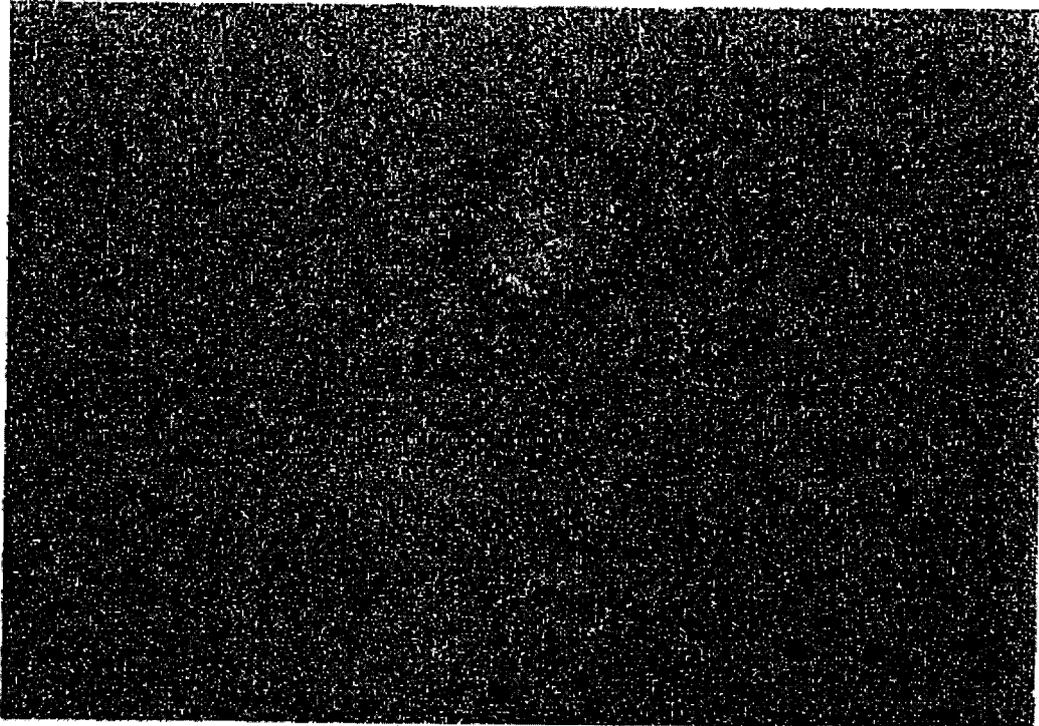
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2B(d) Células CD34+ / CD 38+**



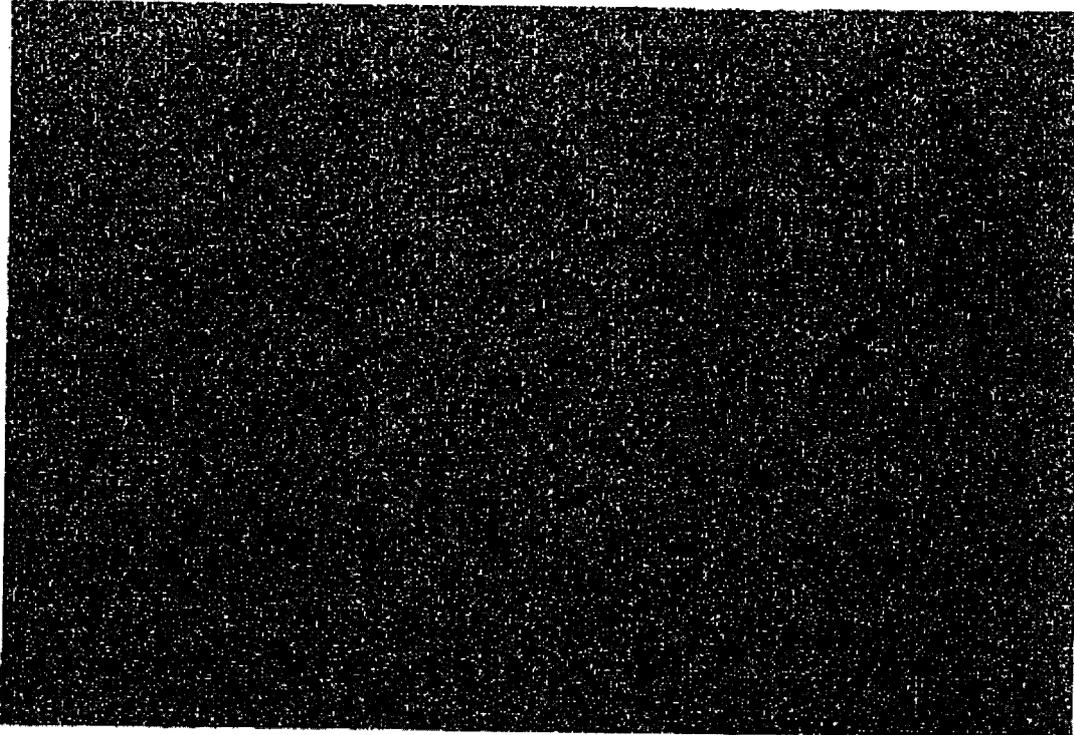
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 2B(e) Células CD34+ / CD 38+**



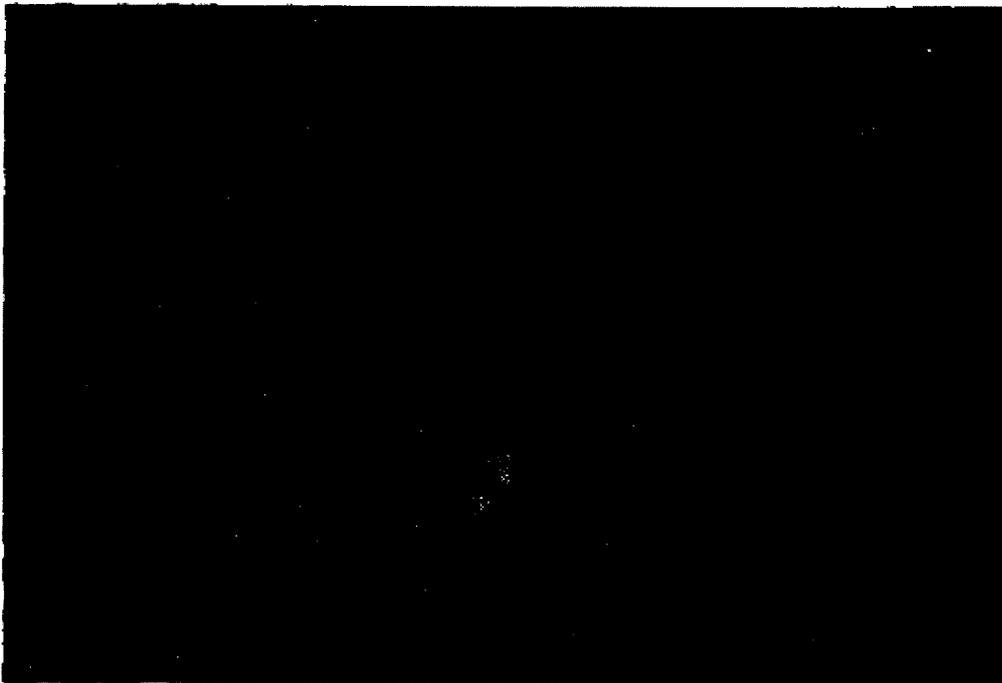
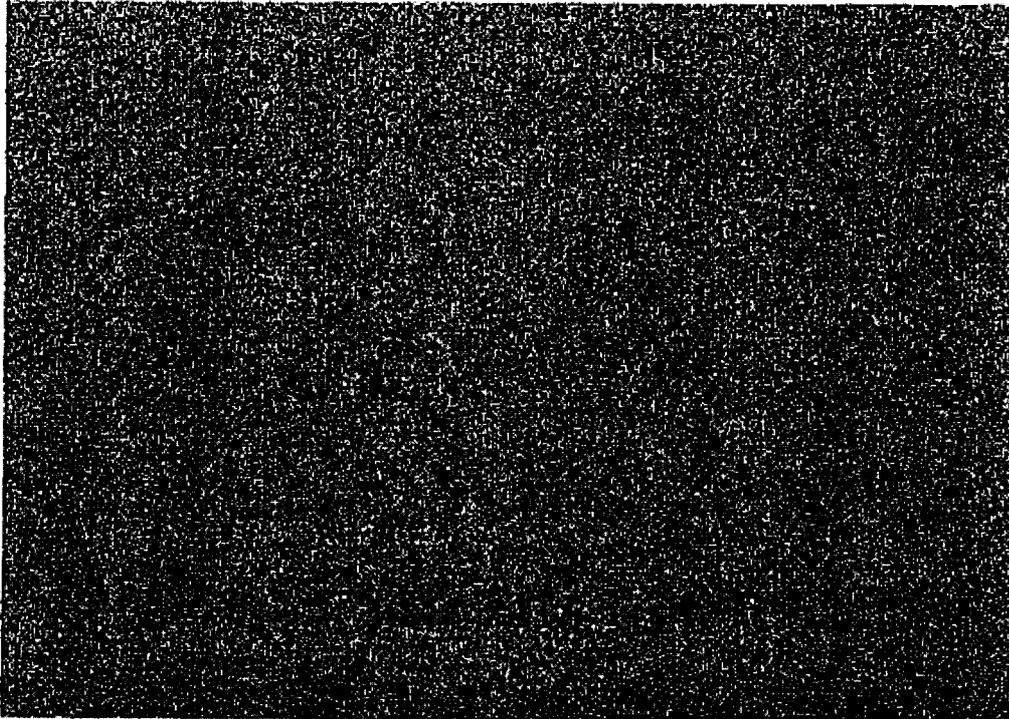
Células CD34+ / CD38+ teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 3(a) Células CD34+ / CD 38-**



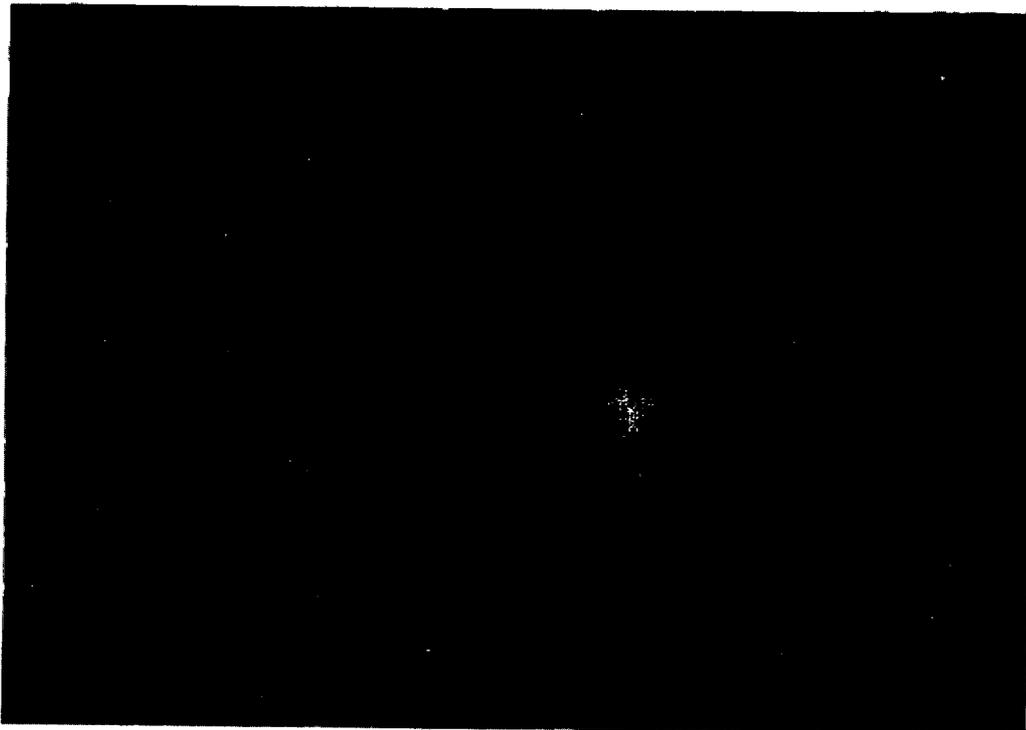
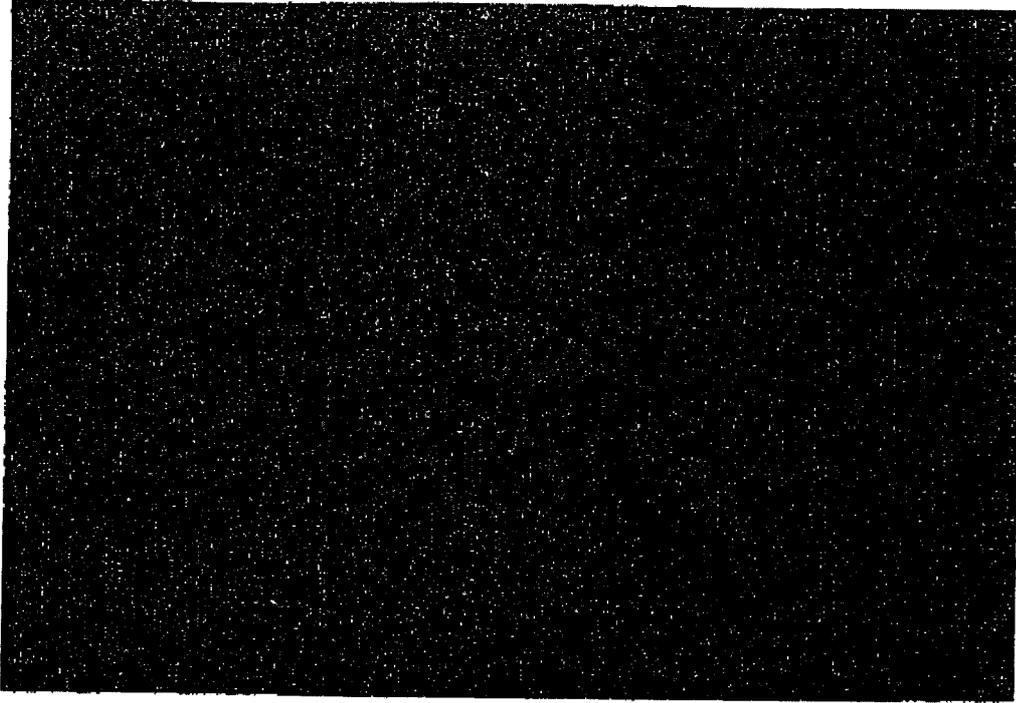
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 3(b) Células CD34<sup>+</sup> / CD 38<sup>-</sup>**



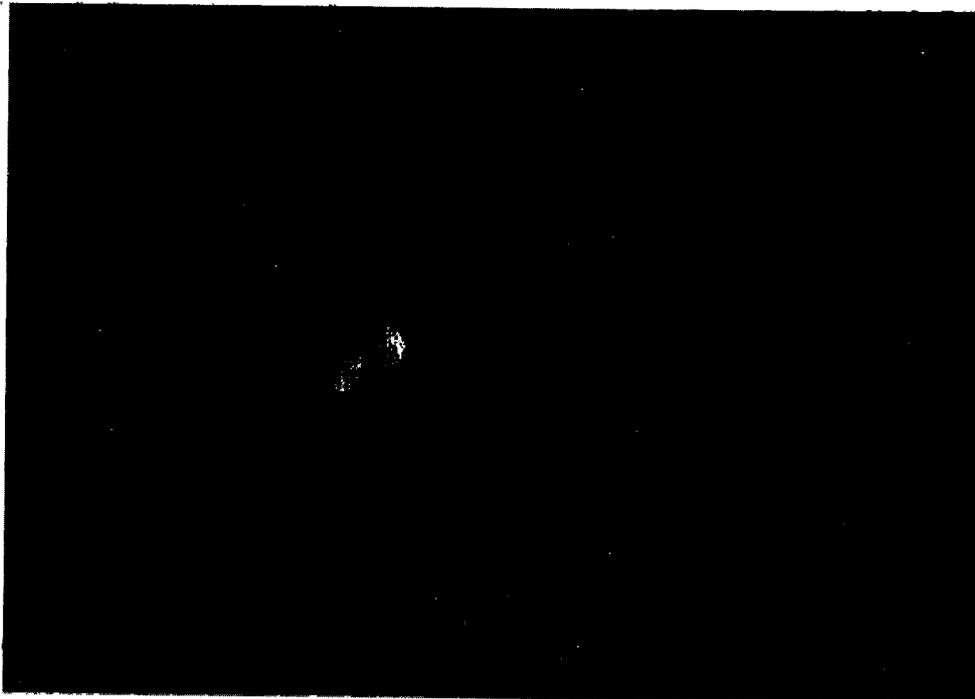
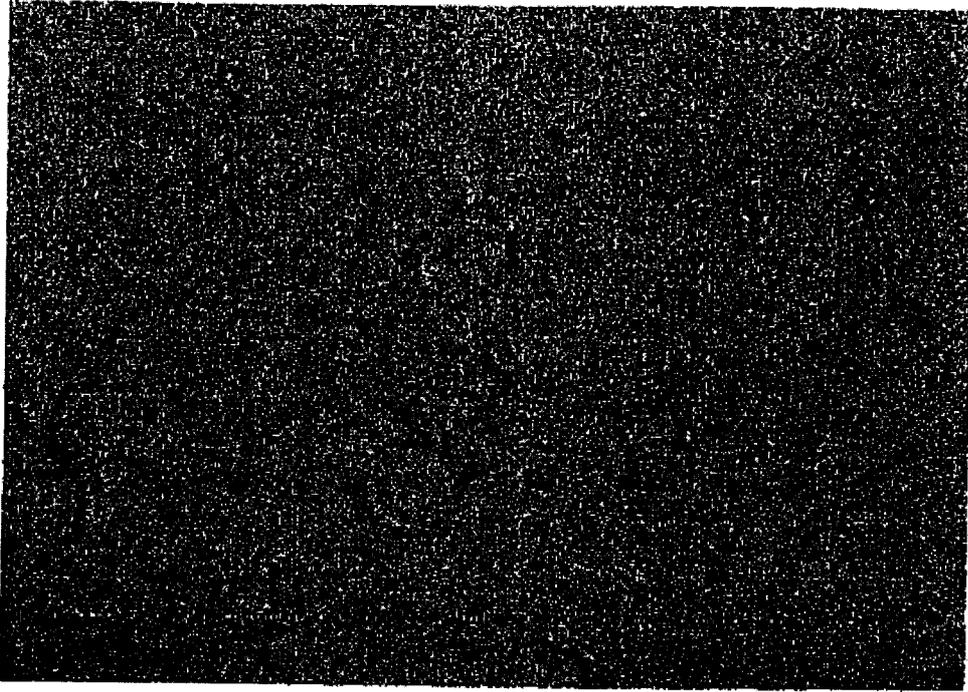
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 3(c) Células D34+ / CD 38-**



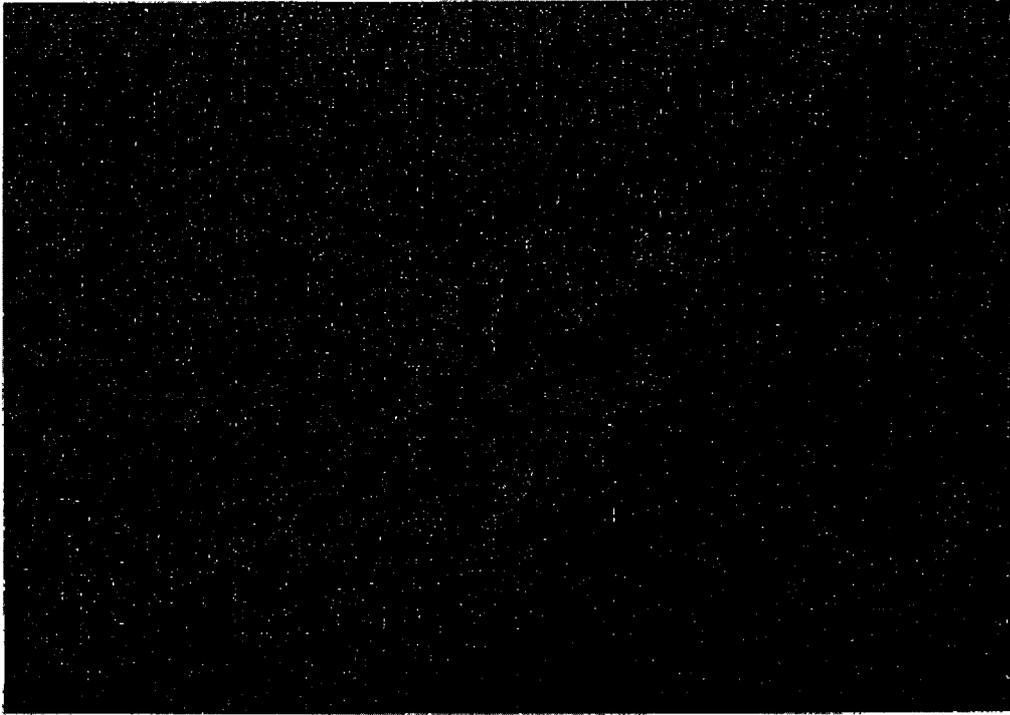
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 3(d) Células CD34+ / CD 38-**



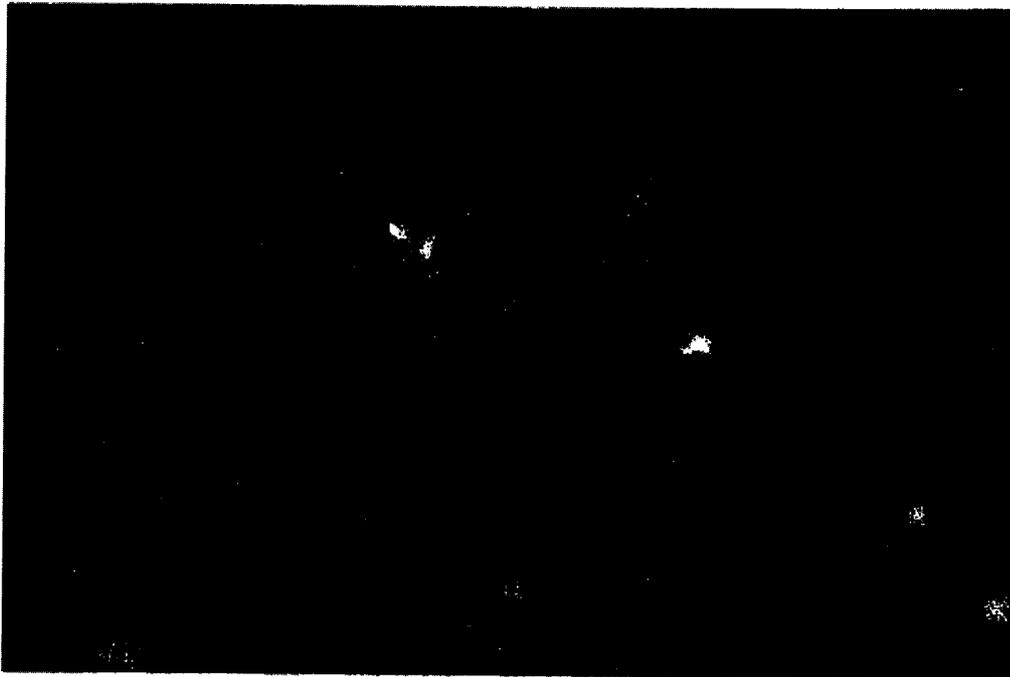
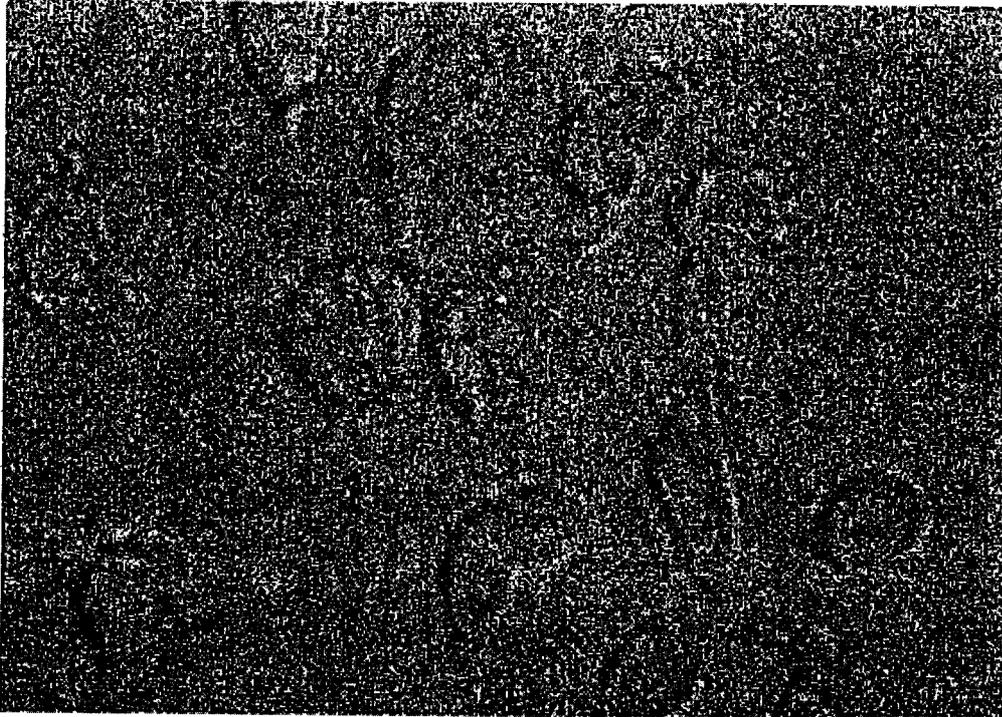
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 3(e) Células CD34+ / CD 38-**



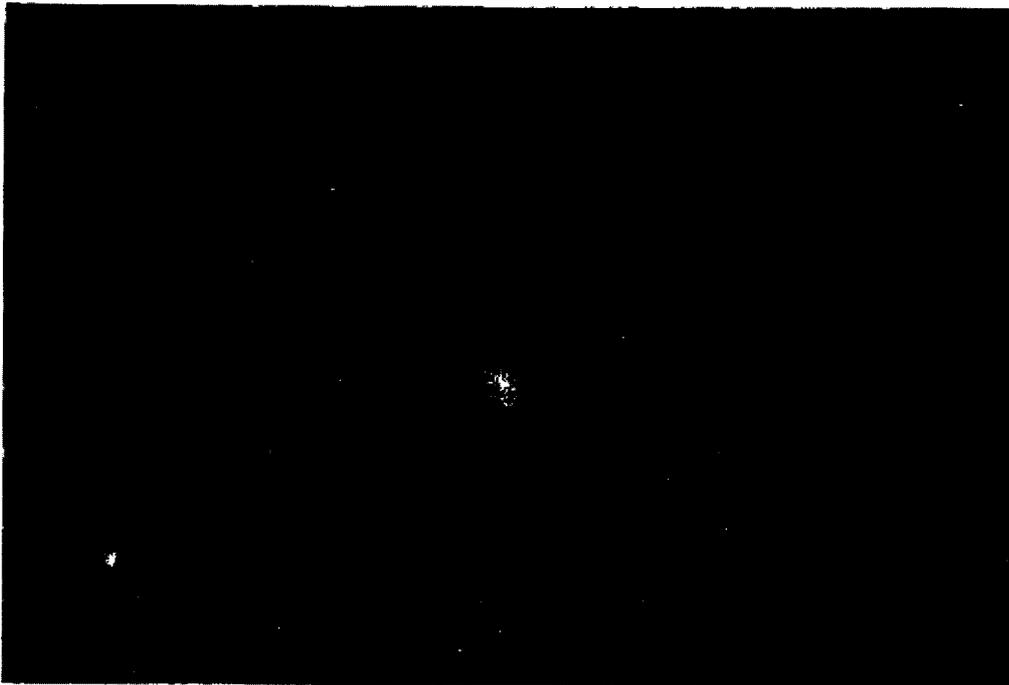
Células CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup> teñidas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 4(a) Células CD34+ / CD 38+**



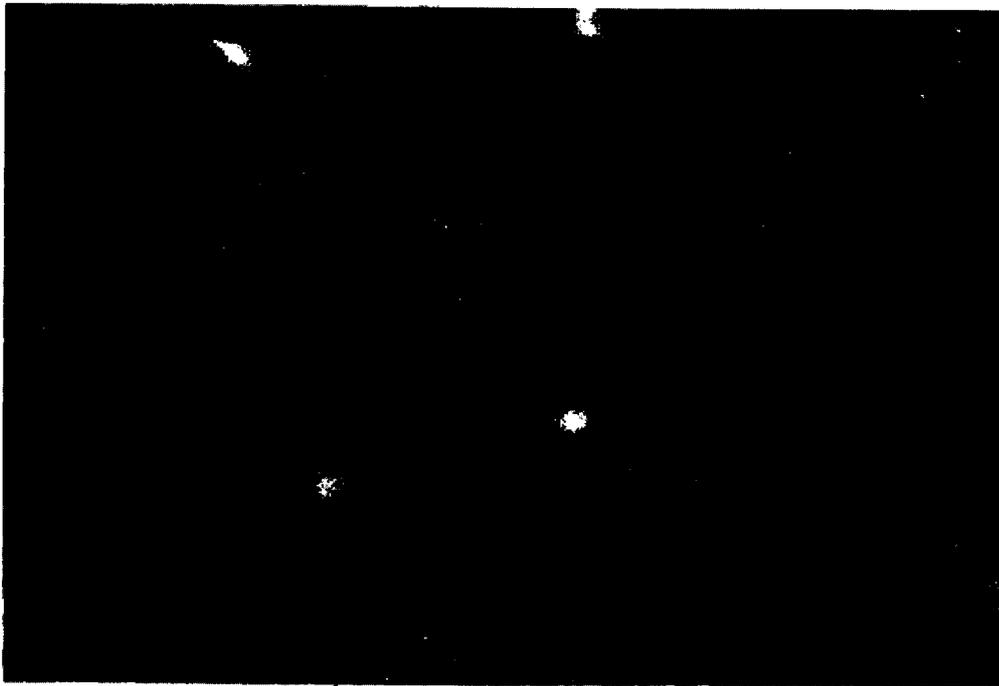
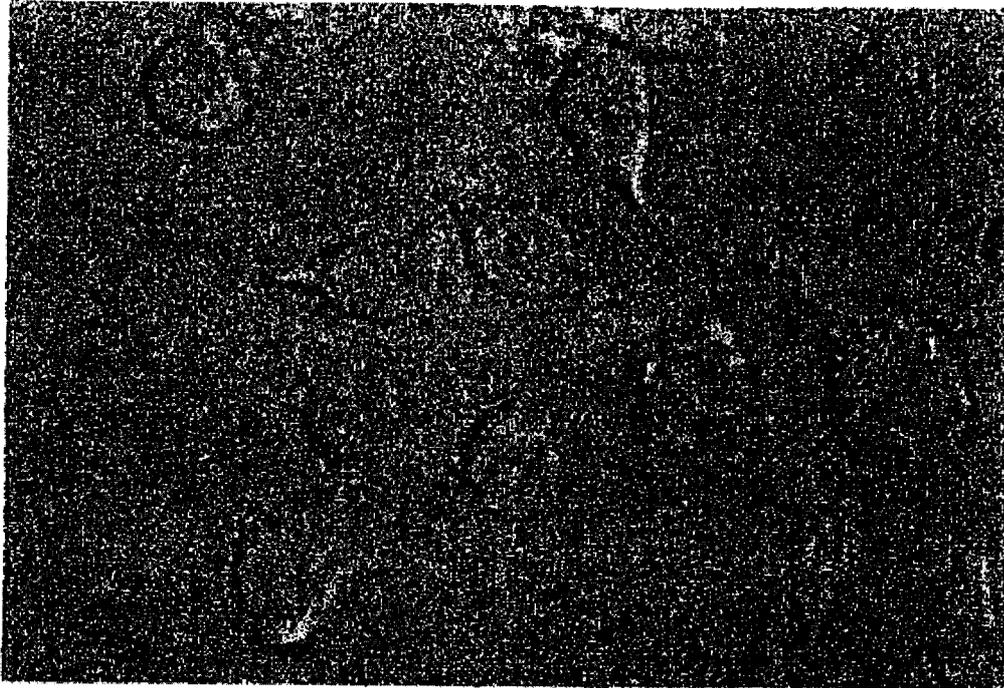
Células CD34+ / CD38+ entrecruzadas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 4(b) Células CD34+ / CD 38+**



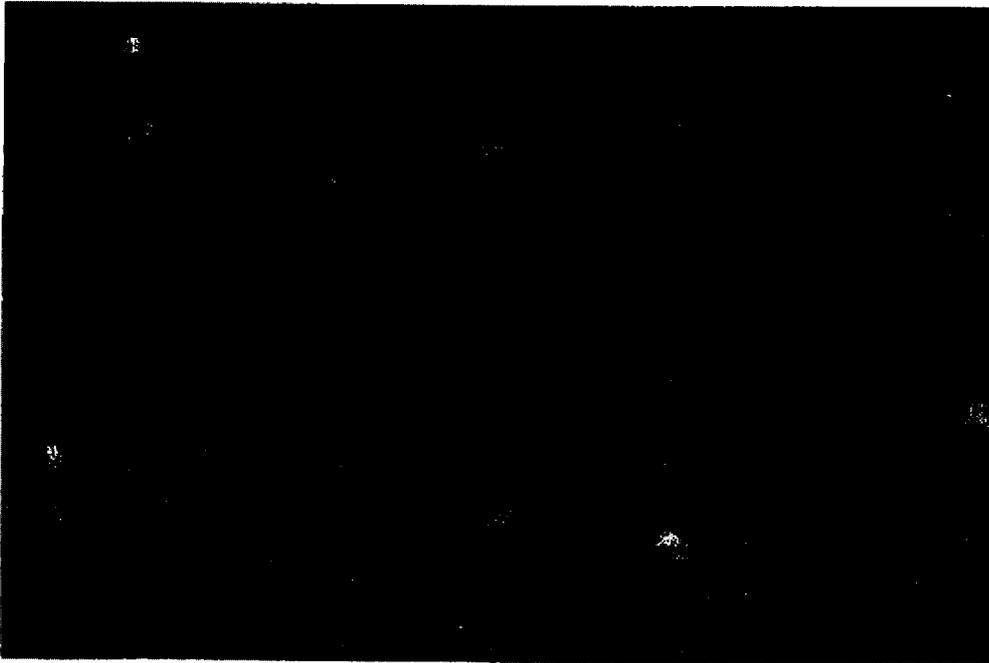
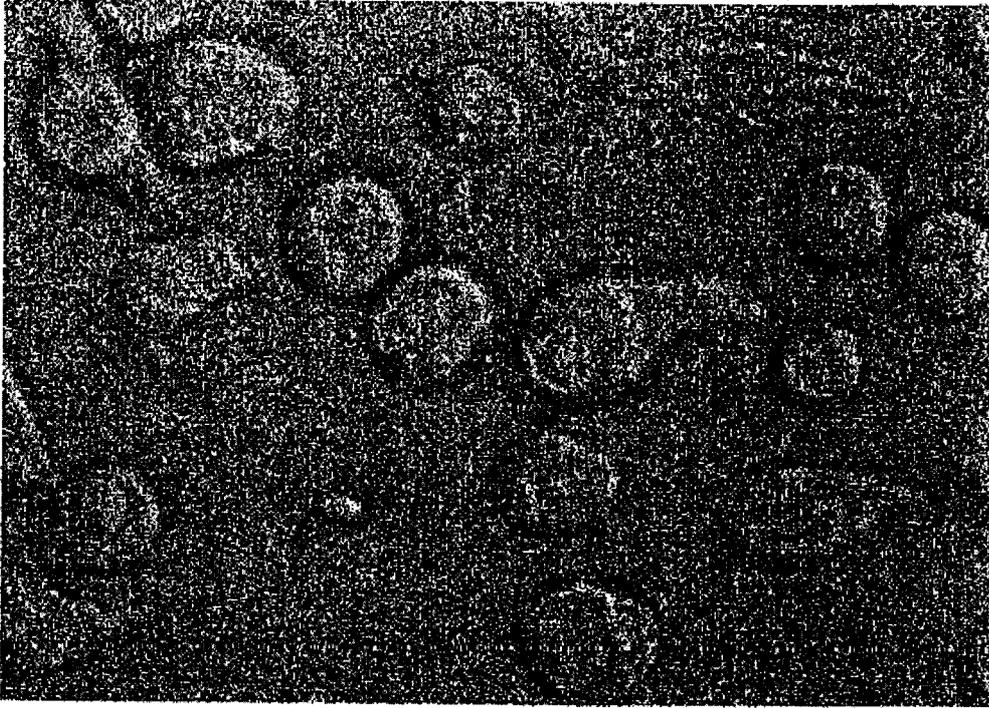
Células CD34+ / CD38+ entrecruzadas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 4(c) Células CD34+ / CD 38+**



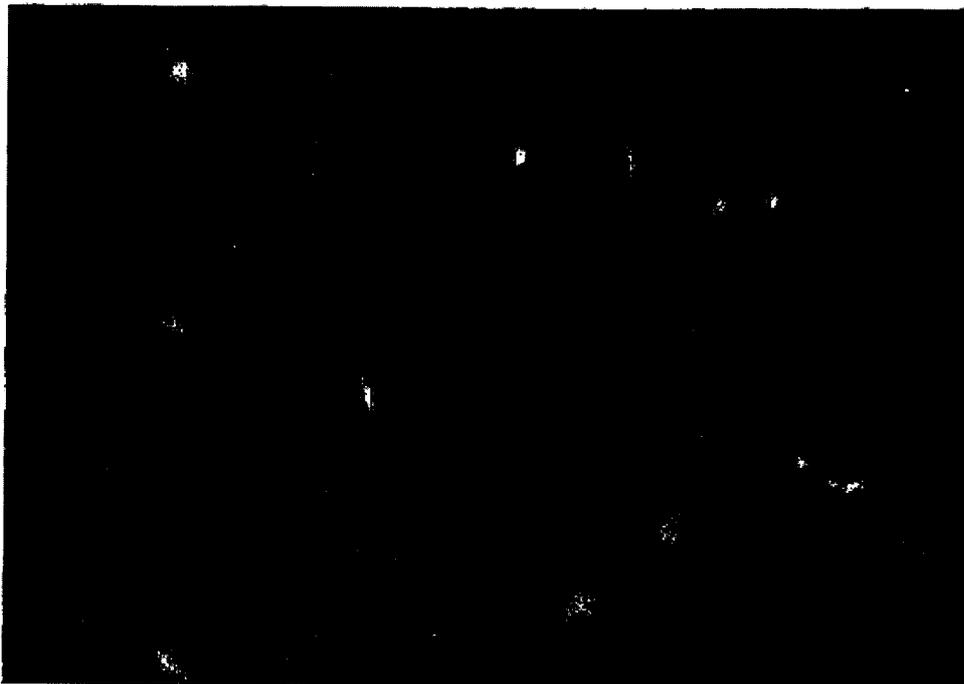
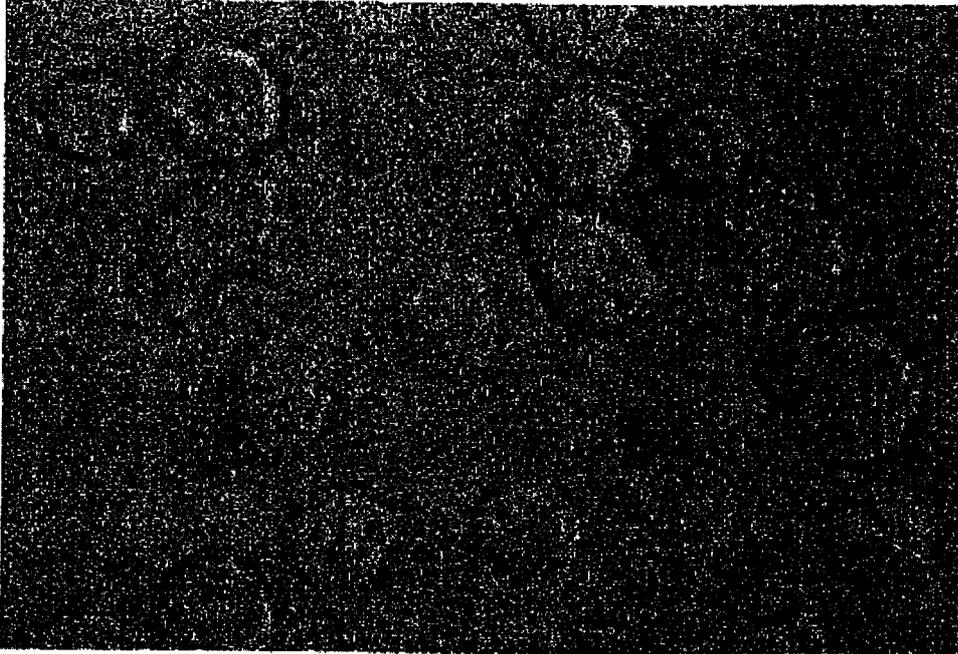
Células CD34+ / CD38+ entrecruzadas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 4(d) Células CD34+ / CD 38+**



Células CD34+ / CD38+ entrecruzadas con anticuerpos anti ACA

**Fig. 4(e) Células CD34+ / CD 38+**



Células CD34+ / CD38+ entrecruzadas con anticuerpos anti ACA

**Referencias citadas en la descripción**

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10 EP 1391463A1 [0005][0010][0028]

DE 19608813 C2 [0012][0013]

15 EP 0695351 81 [0013]

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

**Becker-Kojic'; Terness.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 40472-40478 [0005]

20 **Wahl et al.** *J. Nucl. Med.*, 1983, vol. 24, 316-325 [0014]

**Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0016]

25 **Simons; Ikonen.** *Nature*, 1996, vol. 387, 569-572 [0021]

**Stefanova et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 1016-1019 [0023]

**Curl et al.** *Blood*, 1996, vol. 88,41 02-4109 [0024]

30 **P. Mollee et al.** *Bone Marrow Transplant*, 2002, vol. 30, 273-278 [0027]