

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 055**

51 Int. Cl.:  
**A01N 1/02** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03003275 .9**  
96 Fecha de presentación: **08.02.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1332673**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **Procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2012**

73 Titular/es:  
**GAMIDA CELL LTD. (50.0%)**  
**5 NAHUM HAFZADI STREET, OFER BUILDING**  
**GIVAT SHAUL**  
**95484 JERUSALEM, IL y**  
**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND**  
**DEVELOPMENT LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**PELED, TONY;**  
**FIBACH, EITAN y**  
**TREVES, AVI**

74 Agente/Representante:  
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 391 055 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

Procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras

**Campo y antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para imponer proliferación pero restringir la diferenciación de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal tratando con quelantes o metales de transición, dando como resultado reducción en disponibilidad de metales de transición.

**Diferenciación y proliferación celular**

10 La producción normal de células sanguíneas (hematopoyesis) implica los procesos de proliferación y diferenciación que están estrechamente relacionados. En la mayoría de las células hematopoyéticas después de la división en las células descendientes experimentan una serie de cambios progresivos que con el tiempo culminan en células sanguíneas funcionales completamente diferenciadas (maduras), que en su mayor parte están desprovistas del potencial proliferativo.

15 Por lo tanto, el proceso de diferenciación limita, y con el tiempo detiene, la división celular. Solamente en una pequeña minoría de las células hematopoyéticas, conocidas como células madre, la división celular puede dar como resultado descendencia que sea similar o idéntica a sus células parentales. Este tipo de división celular, conocida como autorrenovación, es una propiedad inherente de las células madre y ayuda a mantener un pequeño grupo de células madre en su estado más indiferenciado. Algunas células madre pierden su capacidad de autorrenovación y después de la división celular se diferencian en diversos tipos de progenitores comprometidos con un linaje que finalmente dan lugar a células maduras. Mientras que estas últimas proporcionan la capacidad funcional del sistema de células sanguíneas, las células madre son responsables del mantenimiento de la hematopoyesis a lo largo de la vida a pesar de una pérdida continua de las células más diferenciadas a través de apoptosis (muerte celular programada) y/o retirada activa de células maduras envejecidas por el sistema reticuloendotelial.

25 Como se detalla adicionalmente posteriormente, la expansión de las subpoblaciones de células madre y otras células linfohemopoyéticas definidas por cultivo *ex vivo* podría tener importantes aplicaciones clínicas.

30 Se ha sugerido una diversidad de protocolos y se han experimentado con respecto a enriquecimiento de tales poblaciones. Las estrategias experimentales principales incluyen incubación de células mononucleares con o sin selección de CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (8); con diferentes cócteles de factores de crecimiento tempranos y tardíos (17); con o sin suero (7); en cultivos estacionarios, cultivos con intercambio de medio rápido (18) o en perfusión continua (biorreactores) (6); y con o sin capa de células del estroma establecida (19).

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

35 Por lo tanto, estos cultivos no dan como resultado verdadera expansión de células madre, sino más bien proliferación y diferenciación de las células madre en células preprogenitoras, acompañado de empobrecimiento del grupo de células madre primitivas.

40 Para conseguir expansión *ex vivo* máxima de células madre deberían cumplirse las siguientes condiciones: (i) la diferenciación debería inhibirse o retardarse de forma reversible y (ii) la autorrenovación debería prolongarse al máximo.

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

La posible implicación del cobre en desarrollo de células hemopoyéticas pudo inferirse a partir de los siguientes hallazgos:

45 **Síntomas clínicos de deficiencia de Cobre:** La deficiencia de cobre puede resultar de defectos hereditarios, tales como síndrome de Menkes o enfermedad Celiaca, o de afecciones adquiridas. Lo último se asocia típicamente con desnutrición. Puede causarse por nutrición parenteral total no complementada de Cobre (por ejemplo después de resección intestinal), por consumo de altos niveles de Cinc, que interfiere en la utilización del Cobre, en neonatos con peso insuficiente y/o alimentados con leche de vaca (fuente escasa de Cobre), que pueden dar como resultado casos graves de síndrome de Shwachman. El tratamiento no equilibrado con quelantes de Cobre en casos de sobrecarga de Cobre tales como en enfermedad de Wilson también puede conducir a deficiencia de Cobre.

Los síntomas clínicos de deficiencia de Cobre pueden incluir alteración del crecimiento, desarrollo cerebral, fuerza y morfología ósea, contractilidad miocárdica, metabolismos del colesterol y la glucosa, mecanismos de defensa del huésped (inmune) y más.

Es de particular importancia para este estudio que la deficiencia de Cobre se asocia con frecuencia con anomalías hematológicas, incluyendo anemia, neutropenia y trombocitopenia. Ninguna de estas manifestaciones patológicas responde a terapia con hierro, pero se invierten rápidamente después de complementación con Cobre (27-28).

5 El mecanismo por el que la deficiencia de Cobre conduce a neutropenia se desconoce. Entre las posibles causas, solas o en combinación, están: (i) muerte temprana de células progenitoras en la médula ósea (BM); (ii) formación alterada de neutrófilos a partir de células progenitoras en la BM; (iii) reducción de la tasa de maduración celular en la BM; (iv) liberación alterada de neutrófilos de la BM a la circulación; (v) tasa de eliminación potenciada de neutrófilos en circulación.

10 La examinación de la BM de pacientes deficientes en Cobre neutropénicos demuestra la ausencia de células maduras ("detención de maduración"). Se ha mostrado que las células derivadas de tal BM no formaron colonias en medio semisólido que contenía suero deficiente en Cobre, pero conservaron el potencial de crecimiento de colonias normal en suero que contenía Cobre. Estos resultados indican la presencia de progenitores intactos en la BM del paciente, y sugieren que el bloqueo en el desarrollo se produce distante a la etapa progenitora (29-30).

15 **El efecto del Cobre en las líneas celulares:** El efecto del Cobre también se estudió *in vitro* en líneas celulares establecidas (31-34). Una línea tal (HL-60) se derivó de un paciente con leucemia promielocítica aguda. Estas células, que tienen las características de mieloblastos y promielocitos, pueden crecer indefinidamente en cultivo. Tras la adición de diversos agentes, tales como ácido retinoico (RA), al medio de cultivo, las células experimentan diferenciación, que da como resultado células que demuestran algunas, pero no todas, de las características de granulocitos maduros.

20 El estudio del estado del Cobre en estas células ha mostrado que aunque el contenido de Cobre citosólico por célula no fue significativamente diferente en células tratadas con RA en comparación con células no tratadas, el contenido de Cobre por contenido de proteína se dobló. Esto se debe al hecho de que las células tratadas con RA tienen aproximadamente la mitad de contenido de proteína en comparación con su homólogo no tratado. Usando <sup>67</sup>Cu, también se ha mostrado que la velocidad de captación de Cobre fue significativamente más rápida durante los dos primeros días de tratamiento con RA, pero no en momentos posteriores. La distribución intracelular de <sup>67</sup>Cu se descubrió predominantemente en fracciones de peso molecular (PM) alto (> 100 kD) y una fracción de PM inferior de aproximadamente 20 kD, con una proporción más alta de Cobre presente en las fracciones de PM alto en células tratadas con RA.

30 La adición de Cobre en exceso a medio de crecimiento complementado con suero regular aumentó modestamente la diferenciación inducida por RA. Aunque las células HL-60 tratadas con RA no representan necesariamente desarrollo celular normal, estos resultados apuntan a la posibilidad de que la diferenciación de neutrófilos pueda requerir Cobre.

35 En otros experimentos se ha mostrado que pueden prepararse células HL-60 deficientes en Cobre mediante tratamiento con quelantes de Cobre, y que después de tal tratamiento su viabilidad y tasa de crecimiento no se vieron afectadas.

Aunque todos estos fenómenos se han atribuido al Cobre, se ha indicado que algunos efectos clínicos y biológicos están compartidos por el Cobre y otros metales de transición.

40 Por ejemplo, pudieron observarse síntomas clínicos similares a los observados en deficiencia de Cobre después de consumo de altos niveles de Cinc (40-42), que se ha sabido que interfieren con la utilización del Cobre (por ejemplo 43).

En un estudio de carcinoma hepatocelular se descubrió que las concentraciones tanto de Cobre como de Cinc en el tejido tumoral se redujeron con el grado de diferenciación histológica (44).

45 En otro estudio se mostró que la adición de Cobre, Cinc y Hierro a cultivos primarios de hepatocitos de rata indujo replicación celular y formación de estructuras de tipo conducto. Las células que recubrían los conductos se volvieron morfológica y bioquímicamente características de células de los conductos biliares (45).

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

55 Mientras se reducía la presente invención a la práctica, se descubrió que una serie de agentes químicos que se unen con (quelan) metales de transición, Cobre en particular, pueden inhibir (retardar) el proceso de diferenciación de células madre así como células progenitoras intermedias y tardías y de este modo estimular y prolongar la fase de proliferación de células activas *ex vivo*. Este efecto recién descubierto del empobrecimiento de Cobre y otros metales de transición (empobrecimiento parcial o completo) se usó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos

tipos de células hematopoyéticas.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes artículos.

- 5 1. Una población de células madre hematopoyéticas expandida obtenida por cultivo *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal sembradas en un medio de cultivo que proporciona dichas células madre con condiciones para proliferación celular y en presencia de tetraetilenpentamina (TEPA), en la que dicho medio de cultivo comprende citocinas de actuación temprana; y
- 10 en la que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado (i) mayor proliferación de células madre prolongada; (ii) mayor expansión a largo plazo de células clonogénicas; y (iii) mantenimiento de un mayor porcentaje de células madre de sangre del cordón umbilical no diferenciadas en su estado no diferenciado en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA,
- 15 inhibiendo de este modo la diferenciación permitiendo a la vez la expansión de dicha población de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical en dicho medio de cultivo,
- y en la que dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical por lo tanto se expanden pero no se diferencian más en comparación con células madre de sangre de cordón umbilical sembradas *ex vivo* a partir de las que se expandió dicha población de células madre y
- 20 progenitoras hematopoyéticas expandidas.
2. La población de células madre y progenitoras expandidas del artículo 1, en la que dichas células madre sembradas se enriquecen con respecto a células hematopoyéticas progenitoras tempranas no diferenciadas.
3. La población de células de uno cualquiera de los artículos 1 o 2, en la que dichas células madre y
- 25 progenitoras hematopoyéticas sembradas se enriquecen con respecto a células hematopoyéticas CD34+.
4. La población de células madre del artículo 1, en la que dichas citocinas de actuación temprana se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombotopoyetina e interleucina-3.
5. La población de células madre del artículo 1, en la el medio de cultivo comprende adicionalmente
- 30 citocinas de actuación tardía.
6. La población de células madre del artículo 5, en la que dichas citocinas de actuación tardía se seleccionan del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.
7. La población de células madre y progenitoras expandidas del artículo 1, en la dichas células madre y
- 35 progenitoras se transducen con un exógeno.
8. Una composición farmacéutica que comprende la población de células madre y progenitoras de uno cualquiera de los artículos 1 a 7.
9. Un procedimiento para expandir células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal *ex vivo*, inhibiendo a la vez la diferenciación de dichas células madre y progenitoras,
- 40 comprendiendo el procedimiento proporcionar a dichas células madre y progenitoras de sangre de cordón umbilical *ex vivo* condiciones para proliferación celular y con tetraetilenpentamina (TEPA), en el que dichas condiciones para proliferación incluyen proporcionar citocinas de actuación temprana; y en el que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado (i) mayor proliferación prolongada; (ii) mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas (cUFC); y (iii) mantenimiento de un porcentaje mayor de células indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y
- 45 progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA; inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical *ex vivo*.
10. El procedimiento del artículo 9, en el que dichas citocinas de actuación temprana se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombotopoyetina e interleucina-3.
- 50 11. El procedimiento del artículo 9, que comprende adicionalmente proporcionar citocinas de actuación tardía.

12. El procedimiento del artículo 11, en el que dichas citocinas de actuación tardía se seleccionan del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.
- 5 13. El procedimiento del artículo 9, en el que dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas son células hematopoyéticas tempranas y/o células progenitoras hematopoyéticas.
14. El procedimiento del artículo 9, que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una población de células hematopoyéticas enriquecidas con respecto a células madre hematopoyéticas.
15. El procedimiento del artículo 9, en el que dichas células madre se enriquecen con respecto a células CD34+ hematopoyéticas.
- 10 16. Un procedimiento para transducir células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas expandidas con un exógeno, comprendiendo el procedimiento:
- (a) expandir e inhibir la diferenciación de células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical.
- 15 (i) proporcionando a dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical condiciones para proliferación celular, en las que las condiciones para proliferación celular comprenden proporcionar citocinas de acción temprana,
- 20 (ii) poniendo en contacto dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical con tetraetilenpentamina (TEPA), en las que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado mayor proliferación prolongada; mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas (cUFC); y mantenimiento de un mayor porcentaje de células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA; inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras *ex vivo*; y
- 25 (b) transducir dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas expandidas con el exógeno.
17. El procedimiento del artículo 16, en el que dicha transducción se efectúa mediante un vector que incluye el exógeno.
- 30 18. Un procedimiento para preparar células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas expandidas para trasplante a un receptor, comprendiendo el procedimiento:
- (a) expandir e inhibir la diferenciación de dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical.
- 35 (i) proporcionando a dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical condiciones para proliferación celular, en las que dichas condiciones para proliferación celular comprenden proporcionar citocinas de actuación temprana;
- 40 (ii) poniendo en contacto dichas células madre y progenitoras con tetraetilenpentamina (TEPA), en las que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado mayor proliferación prolongada, mayor expansión a largo plazo de células clonogénicas (cUFC), y mantenimiento de un mayor porcentaje de células indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA, inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras del cordón umbilical *ex vivo*; y
- 45 (b) aislar dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas expandidas.
19. El procedimiento del artículo 18, que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una población de células hematopoyéticas enriquecidas con respecto a células madre hematopoyéticas.
- 50 20. El procedimiento del artículo 19, en el que dichas células madre hematopoyéticas se enriquecen con respecto a células CD34+ hematopoyéticas.
21. Un procedimiento de conservación de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del

cordón umbilical neonatal indiferenciadas que comprende poner en contacto las células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas con tetraetilenpentamina (TEPA); y en el que dicho contacto se realiza en al menos una de las etapas de recogida, aislamiento y almacenamiento de las células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas.

5 22. El procedimiento del artículo 21, en el que dichas células madre y progenitoras son células madre hematopoyéticas.

23. El procedimiento del artículo 22, en el que dichas células madre hematopoyéticas se enriquecen con respecto a células CD34+.

10 24. Una bolsa de recogida de células madre, complementada con una cantidad de tetraetilenpentamina (TEPA) suficiente para inhibir la diferenciación de una población de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical indiferenciadas, en la que dichas células madre son células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical indiferenciadas.

Se describe en el presente documento un procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras *in vivo* o *ex vivo*.

15 Se desvela un procedimiento para expandir una población de células, inhibiendo al mismo tiempo la diferenciación de las células, comprendiendo el procedimiento la etapa de proporcionar a las células condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición. Como resultado la diferenciación de las células se inhibe mientras que la expansión, o la proliferación de las células se acelera.

20 Las células pueden estar *in vivo*, cuando las condiciones para proliferación celular se proporcionan de forma natural, mientras que la reducción de la capacidad de las células en la utilización de metales de transición se efectúa administrando un quelante de metales de transición y/o Cinc.

25 El quelante de metales de transición puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes quelantes de poliamina, etilendiamina, dietilentriamina, trietilentetramina, trietilendiamina, tetraetilenpentamina, aminoetilanolamina, aminoetilpiperacina, pentaetilenhexamina, clorhidrato de trietilentetramina, clorhidrato de tetraetilenpentamina, clorhidrato de pentaetilenhexamina, tetraetilpentamina, captopril, penicilamina y péptidos de unión a metales de transición.

Como se describe en el presente documento las células pueden estar *ex vivo*.

30 Como se describe en el presente documento, pueden proporcionarse a las células condiciones para proliferación celular que incluyen proporcionar a las células nutrientes y citocinas.

Como se describe en el presente documento las citocinas pueden ser citocinas de actuación temprana.

Como se describe en el presente documento las citocinas de actuación temprana pueden seleccionarse del grupo que consiste en factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombopoyetina e interleucina-3.

Como se describe en el presente documento las citocinas pueden ser citocinas de actuación tardía.

35 Como se describe en el presente documento las citocinas de actuación tardía pueden seleccionarse del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

40 Como se describe en el presente documento las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células hematopoyéticas, células neurales y células oligodendrocíticas, células cutáneas, células hepáticas, células musculares, células óseas, células mesenquimales, células pancreáticas, condrocitos y células del estroma.

Las células pueden derivar de una fuente seleccionada del grupo que consiste en médula ósea, sangre periférica y sangre del cordón umbilical neonatal.

Las células pueden enriquecerse con respecto a células hemopoyéticas CD<sub>34</sub>+

45 Las células pueden seleccionarse del grupo que consiste en células madre no diferenciadas y células progenitoras comprometidas.

50 Se describe en el presente documento un procedimiento para trasplantes de células hemopoyéticas que comprenden las etapas de (a) obtener células hemopoyéticas para trasplantar de un donante; (b) proporcionar a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células; y (c) trasplantar las células a un paciente.

El donante y el paciente pueden ser un individuo único.

La obtención de las células hemopoyéticas puede ser de una fuente seleccionada del grupo que consiste en sangre periférica, médula ósea y sangre del cordón umbilical neonatal.

5 Obtener las células hemopoyéticas puede incluir adicionalmente enriquecer las células con respecto a células madre.

Obtener las células hemopoyéticas puede incluir adicionalmente enriquecer las células con respecto a células progenitoras.

10 Se describe en el presente documento un procedimiento para transducir células madre con un exógeno que comprende las etapas de (a) obtener células madre para transducir; (b) proporcionar a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células; y (c) transducir las células con el exógeno.

La transducción puede efectuarse mediante un retrovirus que incluye el exógeno.

15 Se describe en el presente documento un procedimiento de inmunoterapia adoptiva que comprende las etapas de (a) obtener células hemopoyéticas progenitoras de un paciente; (b) proporcionar a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células; y (c) trasplantar las células al paciente.

20 Se describe en el presente documento un procedimiento de movilización de células madre de la médula ósea a la sangre periférica de un donante para recoger las células que comprende la etapa de (a) administrar al donante un agente para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de las células madre, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células madre; y (b) recoger las células por leucoferesis.

25 El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de administrar al donante una citocina, por ejemplo, una citocina de actuación temprana, tal como, pero sin limitación, factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina 6, trombopoyetina, interleucina 3, y/o en combinación con una citocina de actuación tardía, tal como, pero sin limitación, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un quelante de metales de transición y Cinc.

30 Se describe en el presente documento un procedimiento para desacelerar la maduración/diferenciación de células precursoras eritroides para el tratamiento de pacientes  $\beta$ -hemoglobinopáticos que comprenden la etapa de administrar al paciente un agente para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de células madre, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células madre, de modo que tras la retirada natural del agente del cuerpo, las células experimentan maduración acelerada dando como resultado producción elevada de hemoglobina fetal.

35 El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un quelante de metal de transición y Cinc.

40 Se describe en el presente documento una célula cultivada *ex vivo* terapéutica; preparación que comprende células *ex vivo* propagadas en presencia de un agente, reduciendo el agente una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un quelante de metales de transición y Cinc.

Se describe en el presente documento un procedimiento de conservación de células madre que comprende la etapa de manipular la célula madre en al menos una de las etapas seleccionadas del grupo que consiste en recogida, aislamiento y almacenamiento, en presencia de un quelante de metales de transición.

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

50 La presente invención aborda de forma exitosa los defectos de las configuraciones conocidas en la actualidad proporcionando un procedimiento para propagar células, pero retardando su diferenciación por deficiencia de metales de transición.

Se describen características adicionales y ventajas del procedimiento de acuerdo con el procedimiento de la presente invención posteriormente en el presente documento.

**Breve descripción de los dibujos**

La invención descrita en el presente documento, solamente como ejemplo, en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

5 La FIGURA 1 muestra el efecto a corto plazo de TEPA en el potencial clonogénico de células CD34. Se sembraron células CD34 derivadas de sangre de cordón umbilical en cultivo líquido, a  $3 \times 10^4$  células/ml, en presencia de citocinas de dosis baja: FLT3 - 5 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, con o sin concentraciones diferentes de TEPA. El día 7, se ensayaron alícuotas de 0,1 ml con respecto a células formadoras de colonias clonando las células en medio semisólido y puntuando las colonias después de 14 días. Se presentan resultados de dos experimentos independientes.

10 La FIGURA 2 muestra el efecto a corto plazo de TEPA en células totales y CD34. Se sembraron en placas células CD34 derivadas de sangre de cordón umbilical en cultivo líquido en presencia de FL - 5 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml, con o sin TEPA (20  $\mu$ M). El día 7, los pocillos se semidespoblaron por retirada de la mitad del volumen de cultivo y reemplazándolo con medio nuevo e IL-3 (20 ng/ml). El día 14, se determinó el porcentaje de células CD34 (derecha) y el número de células totales (izquierda) multiplicado por el factor de dilución.

15 La FIGURA 3 muestra el efecto a largo plazo de TEPA en el número de células y potencial clonogénico de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placas células CD34 derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivo líquido, a  $3 \times 10^4$  células/ml, en presencia de citocinas de dosis alta: FL - 50 ng/ml, SCF - 50 ng/ml, IL-6 - 50 ng/ml, IL-3 - 20 ng/ml, G-CSF - 10 ng/ml, EPO - 1 U/ml, con o sin TEPA (20  $\mu$ M). El día 4, los cultivos se diluyeron 1:10 con 0,9 ml de medio nuevo complementado con citocinas y TEPA. El día 7, 14 y 21, los cultivos se semidespoblaron mediante retirada de la mitad del volumen de cultivo y reemplazándolo con medio nuevo, citocinas y TEPA, como se indica. Se contaron las células del medio recogido y las alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio se clonaron en medio semisólido. Se representa el número de células (arriba) en el cultivo líquido y de colonias (abajo) en el cultivo semisólido, multiplicado por los factores de dilución. \* indica colonias y grupos de células pequeños.

20 La FIGURA 4 muestra el efecto a largo plazo de TEPA en células CD34 cultivadas con citocinas tempranas. Las células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical se sembraron en cultivo líquido en presencia de: FL - 50 ng/ml, SCF - 50 ng/ml, y trombopoyetina (TPO) - 20 ng/ml, con o sin TEPA (10  $\mu$ M). A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron por retirada de la mitad del volumen de cultivo y reemplazándolo con medio nuevo, citocinas y TEPA, como se indica. Se contaron las células del medio recogido y se clonaron alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio en medio semisólido. Se representan los números de células (abajo) en el cultivo líquido y de colonias (arriba) en el cultivo semisólido, multiplicado por los factores de dilución. \* indica que no se desarrollaron colonias.

25 La FIGURA 5 el efecto de TEPA en el desarrollo de precursores eritroides. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica, obtenidas de un donante normal adulto, en el sistema de cultivo líquido de dos fases eritroide (23-25). La segunda fase del cultivo se complementó con o sin TEPA 10  $\mu$ M. Los cultivos se analizaron con respecto a células totales y células que contenían hemoglobina [positivas para bencidina (B<sup>+</sup>)] después de 14 días.

30 Las FIGURAS 6a-d muestran el efecto de TEPA en la maduración celular. Se muestra la morfología de células en cultivos a largo plazo (7 semanas) en ausencia (6a y 6c) y presencia (6b y 6d) de TEPA. Se tiñeron portaobjetos preparados con Cytospin con May-Grunwald Giemsa. Aumentos: 6a y 6b x 600; 6c y 6d x 1485.

35 La FIGURA 7 muestra el efecto de quelantes de metales de transición en el número de células y clonogénicas de cultivos iniciados con células CD<sub>34</sub>. Se sembraron células CD34 derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivos líquidos en presencia de FL- 20 ng/ml, SCF - 20 ng/ml, IL-3 - 20 ng/ml, IL-6 - 20 ng/ml, y TEPA - 10  $\mu$ M, captopril (CAP) - 10  $\mu$ M o Penicilamina (PEN) - 10  $\mu$ M, como se indica. El día 7, las células se contaron y se sembraron en placas alícuotas de cultivo equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio en medio semisólido. Las barras presentan el número de células totales ( $\times 10^3$ /ml) el día 7 y el número de colonias por placa 14 días después de la clonación.

40 La FIGURA 8 muestra el efecto del Cobre en el potencial clonogénico y número de células totales de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placas células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivos líquidos en presencia de citocinas: FL - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 -10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml. Los cultivos se complementaron con sulfato de Cobre - 5  $\mu$ M y TEPA - 20  $\mu$ M, como se indica. El día 7, las células se contaron (abajo) y se sembraron en placas alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio en medio semisólido. Las colonias se puntuaron después de 14 días (arriba).

45 La FIGURA 9 muestra el efecto de iones en el potencial clonogénico de células CD34 cultivadas. Se sembraron en placas células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivos líquidos en

presencia de FL - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml y con o sin TEPA 10  $\mu$ M. Los cultivos se complementaron con sulfato de Cobre - 5 mM, selenita sódica - 5 mM o transferrina saturada de hierro 0,3 mg/ml, como se indica. El día 7, se sembraron en placas alícuotas de cultivo equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio en medio semisólido. Las colonias se puntuaron después de 14 días.

5 La FIGURA 10 muestra el efecto del Cinc en el potencial proliferativo de células CD<sub>34</sub>. Se sembraron en placas células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivos líquidos en presencia de FL - 10 ng/ml, SCF - 10 ng/ml, IL-3 - 10 ng/ml, IL-6 - 10 ng/ml y TEPA 10  $\mu$ M o sulfato de Cinc - 5 mM o ambos. El día 7, se sembraron en placas alícuotas equivalentes a  $1 \times 10^3$  células de inicio en medio semisólido. Las colonias se puntuaron después de 14 días.

10 Las FIGURAS 11a-c muestran el efecto de TEPA en cultivos de CD<sub>34</sub> a largo plazo. Los cultivos se iniciaron con  $10^4$  células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical sembrando en placas células purificadas en medio líquido en presencia de SCF, FLT3 e IL-6 (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml) con o sin TEPA (10  $\mu$ M). A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron por retirada de la mitad de las células seguido de adición de medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas, las células se contaron y se ensayaron con respecto a células formadoras de colonias (cUFC) clonando en medio semisólido. La frecuencia de cUFC se calculó como número de cUFC por número de células. La clonación de células CD<sub>34</sub> purificadas el día 1 produjo  $2,5 \times 10^3$  cUFC por  $10^4$  células de inicio. \* indica que no se desarrollaron colonias.

20 Las FIGURAS 12-14 muestran el efecto de TEPA en la proliferación celular, cUFC y frecuencia de cUFC en presencia de diferentes combinaciones de citocinas tempranas. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre de cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c en medio líquido en presencia de SCF, FLT3 e IL-6 (SCF, FLT, IL-6), cada uno a 50 ng/ml, con o sin TEPA (10  $\mu$ M). Además, los cultivos se complementaron con IL-3 (20 ng/ml), TPO (50 ng/ml) o ambos, como se indica. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas, las células se contaron (Figura 12), se ensayaron con respecto a cUFC (Figura 13) y se calculó la frecuencia de cUFC (Figura 4). \* indica que no se desarrollaron colonias.

25 La FIGURA 15 muestra el efecto de G-CSF y GM-CSF en la frecuencia de cUFC de cultivos de CD<sub>34</sub> complementados con TEPA y control. Las células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical se cultivaron como se detalla en las Figuras 11a-c. Después de una semana, la mitad de los cultivos de control y TEPA se complementaron con las citocinas de actuación tardía G-CSF y GM-CSF (10 ng/ml cada una). A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas 3, 4 y 5, las células se contaron, se ensayaron con respecto a cUFC y se calculó la frecuencia de cUFC.

35 Las FIGURAS 16-17 muestran el efecto de cambio de TEPA + medio parcial o completo en la proliferación celular a largo plazo y producción de cUFC. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. A intervalos semanales, la mitad del contenido de cultivo (células y sobrenadantes) se retiró y se reemplazó por medio nuevo, citocinas con o sin TEPA (cambio parcial). Como alternativa, el contenido completo del cultivo se recogió, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y la mitad de las células y las células restantes se volvieron a cultivar en medio nuevo, citocinas con o sin TEPA (cambio completo). En las semanas indicadas se determinó el número de células (Figura 16) y cUFC (Figura 17).

40 La FIGURA 18 muestra el efecto de TEPA en expansión de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. En las semanas 1, 2 y 3, se enumeraron células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> por citometría de flujo. \* indica que no se desarrollaron colonias.

45 La FIGURA 19 muestra el efecto de adición retardada de TEPA en la frecuencia de cUFC. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. Se añadió TEPA (10  $\mu$ M) al inicio de los cultivos (día 1) o 6 días después. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas 3, 4 y 5, las células se contaron, se ensayaron con respecto a cUFC y se calculó la frecuencia de cUFC.

50 La FIGURA 20 muestra el efecto de preincubación a corto plazo con una citocina sencilla en producción de cUFC a largo plazo. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. Los cultivos se complementaron el día 1 con o sin TEPA (10  $\mu$ M) y con SCF, FLT3, IL-6, (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml). Como alternativa, los cultivos se complementaron el día 1 con TEPA (10  $\mu$ M) y FLT3 (50 ng/ml) como una citocina sencilla. Se añadió SCF, IL-6 (50 ng/ml cada uno) e IL-3 (20 ng/ml) a estos cultivos el día 2. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y TEPA. En las semanas indicadas las células se ensayaron con respecto a cUFC.

5 Las FIGURAS 21a-b muestran el efecto de agentes quelantes de poliaminas en cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre de cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. Los agentes quelantes de poliaminas tetraetilenpentamina (TEPA), pentaetilenhexamina (PEHA), etilendiamina (EDA) o trietilentetramina (TETA) se añadieron a diferentes concentraciones. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y quelantes. En las semanas 3, 4, 6 y 7, las células se contaron y se ensayaron con respecto a cUFC. Los resultados presentados son para concentraciones con actividad óptima: TEPA - 40 mM, PEHA - 40 mM, EDA - 20 mM y TETA- 20 mM.

10 Las FIGURAS 22a-b muestran el efecto de agentes quelantes de metales de transición en cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre de cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. Se añadieron los quelantes Captopril (CAP), Penicilamina (PEN) y TEPA, a diferentes concentraciones. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo, citocinas y quelantes. En las semanas 4, 5 y 7, las células se contaron y se ensayaron con respecto a cUFC. Los resultados presentados son para concentraciones con actividad óptima: TEPA - 10 mM, PEN - 5 mM y CAP - 40 mM.

15 Las FIGURAS 23a-b muestran el efecto del Cinc en cultivos de células CD<sub>34</sub>. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical como se detalla en las Figuras 11a-c. Se añadió Cinc (Zn), a diferentes concentraciones, el día 1. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron como medio nuevo, citocinas y Zn. En las semanas 4, 5 y 7, las células se contaron y se ensayaron con respecto a cUFC.

20 La FIGURA 24 muestra el efecto de TEPA en cultivos de células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre periférica. Se cultivaron células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre periférica como se detalla en las Figuras 11a-c. Los cultivos se complementaron con o sin TEPA. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron y se complementaron con medio nuevo y TEPA. En las semanas 1 y 4, las células se ensayaron con respecto a cUFC. \* indica que no se desarrollaron colonias.

25 **Descripción de la realización preferida**

30 Se desvela un procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras que pueden usarse para proporcionar una preparación celular cultivada *ex vivo* terapéutica que incluye una gran población de células, en la que la diferenciación se inhibió mientras que se propagó la expansión. Específicamente, la presente divulgación puede usarse para proporcionar células madre, así como células progenitoras, para trasplantes de células hematopoyéticas, células madre adecuadas para manipulaciones genéticas, que pueden usarse para terapia génica, y nuevos medios de tratamiento para enfermedades, tales como, pero sin limitación, β-hemoglobinopatía.

35 La presente divulgación se refiere a un procedimiento para controlar la proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para imponer proliferación pero restringir la diferenciación de células madre y progenitoras modificando la disponibilidad de metales de transición, en particular Cobre.

Los principios y funcionamiento de un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones y ejemplos adjuntos.

40 En el transcurso del presente estudio se descubrió que una serie de agentes químicos que se unen con (quelan) Cobre y otros metales de transición, o que interfieren con el metabolismo del Cobre pueden inhibir de forma reversible (retardar) el proceso de diferenciación de células madre así como células progenitoras intermedias y tardías y de este modo estimular y prolongar la fase de proliferación de células activas.

45 Este efecto de nuevo descubrimiento de empobrecimiento de metales de transición se utilizó para maximizar la expansión *ex vivo* de diversos tipos de células hemopoyéticas. Tales células expandidas *ex vivo* pueden aplicarse en varias situaciones técnicas. A continuación se enumeran algunas.

Trasplante de células hemopoyéticas: El trasplante de células hemopoyéticas se ha convertido en el tratamiento de elección para una diversidad de enfermedades heredadas o malignas. Aunque procedimientos de trasplante temprano utilizaban la población de médula ósea completa (BM), recientemente, se han usado poblaciones más definidas, enriquecidas con respecto a células madre (células CD<sub>34</sub><sup>+</sup>) (1).

50 Además de la médula, tales células pueden derivar de otras fuentes tales como sangre periférica (PB) y sangre del cordón umbilical neonatal (CB) (2). En comparación con BM, el trasplante con células de PB acorta el periodo de pancitopenia y reduce los riesgos de infección y hemorragia (3-5).

Una ventaja adicional de usar PB para trasplante es su accesibilidad. El factor limitante para trasplante de PB es el bajo número de células progenitoras/madre pluripotenciales en circulación.

55 Para obtener suficientes células madre derivadas de PB para trasplante, estas células se "recogen" por leucoferesis

repetida después de su movilización desde la médula a la circulación por tratamiento con quimioterapia y citocinas (3-4). Dicho tratamiento obviamente no es adecuado para donantes normales.

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

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

Permite almacenamiento de un número pequeño de células madre de PB o CB para su uso futuro potencial.

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

10 Los cultivos proporcionan un empobrecimiento significativo de linfocitos T, que puede ser útil en la situación de trasplante alogénico para reducir enfermedad de injerto contra huésped.

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

20 Para trasplante exitoso, el acortamiento de la duración de la fase citopénica, así como injerto a largo plazo, es crucial. La inclusión de células progenitoras intermedias y tardías en el trasplante podría acelerar la producción de células maduras derivadas de donante y acorta la fase citopénica. Es importante, por lo tanto, que las células expandidas *ex vivo* incluyan, además de células madre, progenitores más diferenciados para optimizar la recuperación a corto plazo y restauración a largo plazo de hemopoyesis. La expansión de células progenitoras intermedias y tardías, especialmente las comprometidas a los linajes neutrófilos y megacariocíticos, en conjunto con expansión de células madre, debería cumplir este propósito (8).

25 Tales cultivos pueden ser útiles no solamente en la restauración de hematopoyesis en pacientes con ablación de médula ósea completa sino también como medida de soporte para acortar la recuperación de médula ósea después de radio y quimioterapias convencionales.

30 Diagnóstico prenatal de defectos genéticos en células escasas: El diagnóstico prenatal implicó la recogida de células embrionarias de una mujer embarazada y análisis de las mismas con respecto a defectos genéticos. Un modo preferido, no invasivo, de recoger células embrionarias implica separación de precursores de glóbulos rojos nucleados embrionarios que se infiltran en la circulación sanguínea materna. Sin embargo, siendo muy escasas, tales células deberían someterse a expansión celular antes de su análisis. Se describen en el presente documento medios para expandir células embrionarias para diagnóstico prenatal.

35 Terapia Génica: Para una terapia génica a largo plazo exitosa es un requisito obligado una alta frecuencia de células madre transducidas que tengan el transgén integrado en su genoma. En el tejido de BM, aunque la mayoría de las células son progenitores y precursores en ciclo, las células madre constituyen solamente una fracción pequeña de la población celular y la mayoría de ellas están en un estado no en ciclo, de reposo.

Los vectores basados en virus (por ejemplo, retrovirales) requieren división de las células activas para integración del transgén en el genoma huésped. Por estas razones la transferencia del gen a células madre de BM nuevas es muy ineficaz. La capacidad de expandir una población purificada de células madre y regular su división celular *ex vivo* permitiría aumentar la probabilidad de su transducción (9).

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

45 El tratamiento potencia la respuesta inmune requerida o reemplaza funciones deficientes. Este enfoque se utilizó por primera vez clínicamente por Rosenberg y col. (13) usando un gran número de linfocitos T citotóxicos no específicos expandidos *ex vivo* autólogos y posteriormente linfocitos que se infiltran en tumor específico expandidos *ex vivo*.

50 También se mostró que pueden cultivarse células presentadoras de antígenos funcionalmente activas a partir de una población de partida de células de PB CD<sub>34</sub><sup>+</sup> en cultivos soportados por citocinas. Estas células pueden presentar antígenos proteicos solubles para linfocitos T autólogos *in vitro* y, de este modo, ofrecer nuevas perspectivas para la inmunoterapia de enfermedad residual mínima después de quimioterapia de dosis alta. También se estudió la expansión *ex vivo* de células dendríticas presentadoras de antígenos (14-16).

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

Los trastornos de mielina forman un grupo importante de enfermedades neurológicas humanas que hasta el

momento son incurables. El progreso en modelos animales, particularmente en trasplante de células del linaje de oligodendrocitos, ha dado como resultado remielinización local significativa y pruebas fisiológicas de restauración de la función (36). Las terapias futuras podrían implicar tanto trasplante como promoción de la reparación endógena, y los dos enfoques podrían combinarse con manipulación *ex vivo* del tejido donante.

- 5 La Patente de Estados Unidos Nº 5.486.359 enseña células madre mesenquimales humanas aisladas que pueden diferenciarse en más de un tipo tisular (por ejemplo hueso, cartílago, músculo o estroma de la médula) y un procedimiento para aislar, purificar y expandir en cultivo células madre mesenquimales humanas.

10 La Patente de Estados Unidos Nº 5.736.396 enseña procedimientos para inducción dirigida por linaje *in vitro* o *ex vivo* de células madre mesenquimales humanas expandidas en cultivo aisladas que comprenden las etapas de poner en contacto las células madre mesenquimales con un factor bioactivo eficaz para inducir la diferenciación de las mismas a un linaje de elección. Se desvela adicionalmente un procedimiento que también incluye introducir tales células madre mesenquimales inducidas por linaje expandidas en cultivo en un huésped del que se han originado para fines de regeneración o reparación de tejido mesenquimal.

15 La Patente de Estados Unidos Nº 4.642.120 enseña composiciones para reparar defectos de cartílago y huesos. Estas se proporcionan en forma de gel como tales, o incluidas en huesos naturales o artificiales. El gel comprende ciertos tipos de células. Estas pueden ser condrocitos embrionarios comprometidos o cualquier tipo de células originadas en el mesénquima que potencialmente pueden convertirse a células de cartílago, generalmente mediante la influencia de factores inductores condrogénicos, en combinación con fibrinógeno, antiproteasa y trombina.

20 La Patente de Estados Unidos Nº 5.654.186 enseña que las células mesenquimales transportadas por la sangre proliferan en cultivo, e *in vivo*, como se demuestra en modelos animales, son capaces de emigrar a sitios de herida desde la sangre para formar piel.

25 La Patente de Estados Unidos Nº 5.716.411 enseña un procedimiento de regeneración de la piel de una herida o quemadura en un animal o ser humano. Este procedimiento comprende las etapas de cubrir inicialmente la herida con una matriz de colágeno glicosaminoglicano, permitiendo infiltración de la matriz GC injertada por células mesenquimales y vasos sanguíneos de tejido subyacente sano y aplicando una lámina de autoinjerto epitelial cultivado crecida a partir de células epidérmicas tomadas del animal o ser humano en un sitio sin heridas en la superficie corporal del animal o ser humano. El injerto resultante tiene tasas de captación excelentes y tiene la apariencia, crecimiento, maduración y diferenciación de la piel normal.

30 La Patente de Estados Unidos Nº 5.716.616 enseña procedimientos para tratar pacientes que padecen una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por un cartílago de hueso o defectos pulmonares. Los procedimientos que comprenden la etapa de administración intravenosa de células del estroma aisladas de individuos singénicos normales o administración intravenosa de células del estroma aisladas del paciente después de la corrección del defecto genético en las células aisladas. También se desvelan procedimientos para introducir genes en un individuo receptor. Los procedimientos comprenden las etapas de obtener una muestra de médula ósea del individuo receptor o un donante singénico coincidente, aislar células adherentes de la muestra, transfectar las células adherentes que se aislaron del receptor o un donante singénico coincidente con un gen y administrar las células adherentes transfectadas al individuo receptor por vía intravenosa. Se desvelan composiciones que comprenden células del estroma aisladas que incluyen genes exógenos unidos operativamente con secuencias reguladoras.

40 En cada uno de los ejemplos anteriores, se usan células madre y progenitoras no hemopoyéticas como una fuente externa de células para reponer células ausentes o dañadas de un órgano. Dicho uso requiere expansión celular antes de diferenciación para obtener primero la masa celular requerida. En esta etapa el procedimiento descrito en el presente documento puede hacerse altamente eficaz y útil implementando a la vez cualquiera de los procedimientos desvelados en las patentes de Estados Unidos anteriores.

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

50 Movilización de células madre de médula ósea a la sangre periférica (periferización): El descubrimiento del efecto de quelantes de metales de transición también podría aplicarse *in vivo*. Como se ha mencionado anteriormente, las células madre derivadas de PB para trasplante se "recogen" por leucoferesis repetida después de su movilización desde la médula ósea a la circulación por tratamiento con quimioterapia y citocinas (3-4).

El uso de quimioterapia, por supuesto, no es adecuado para donantes normales. La administración de quelantes metálicos de transición, tales como TEPA, al donante podría aumentar el grupo de células madre de la médula, que se moviliza después a la periferia por G-CSF endógeno o inyectado.

55 Leucemia: A diferencia de la hematopoyesis normal, en leucemia, los procesos de proliferación y diferenciación no están acoplados; las células malignas son incapaces de diferenciarse y en consecuencia mantienen capacidad de proliferación continua.

El entendimiento de los acontecimientos moleculares que conducen el desacoplamiento de los procesos de proliferación y diferenciación de progenitores normales después de empobrecimiento de metales de transición, en particular Cobre, puede arrojar luz sobre los procesos celulares implicados en el desarrollo de leucemia.

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

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

10 Se ha sugerido que este fenómeno se asocia con aceleración del proceso de maduración/diferenciación de los precursores eritroides (37).

La administración de quelantes de metales de transición tales como TEPA a pacientes con  $\beta$ -hemoglobinopatías podría en primer lugar aumentar y sincronizar su grupo progenitor eritroide temprano (bloqueando la diferenciación).

15 Después del cese de la administración del fármaco y su retirada del cuerpo, esta población temprana podría después experimentar maduración acelerada que podría dar como resultado producción elevada de hemoglobina fetal.

Por lo tanto, se desvela un procedimiento para expandir una población de células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células. El procedimiento incluye la etapa de proporcionar a las células condiciones para proliferación celular y, a la vez, reducir una capacidad de las células en utilización de metales de transición, tales como Cobre.

20 La reducción de la capacidad de las células en la utilización de metales de transición puede efectuarse, por ejemplo, por empobrecimiento de los mismos (por ejemplo, mediante quelantes adecuados) o mediante interferencia en su metabolismo (por ejemplo, mediante adición de iones de Cinc).

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" se refiere a ralentizar, reducir, retardar, prevenir o suprimir.

25 Como se usa en el presente documento, el término "diferenciación" se refiere a un cambio de tipos relativamente generalizado a especializados durante el desarrollo. La diferenciación celular de diversos linajes celulares es un proceso bien documentado y no requiere descripción adicional en el presente documento.

30 Las células para expandir pueden estar presentes *in vivo*. En este caso las condiciones para proliferación celular se proporcionan de forma natural. Al mismo tiempo, se efectúa reducción de la capacidad de las células en la utilización de metales de transición, tales como, pero sin limitación, Cobre, administrando un metal de transición, por ejemplo, Cobre, quelante, iones de Cinc o ambos.

La administración del quelante de metales de transición y/o iones de Cinc puede ser por una composición farmacéutica que incluye los mismos, que pueden incluir adicionalmente espesantes, transportadores, tampones, diluyentes, agentes tensioactivos, conservantes y similares, todos conocidos también en la técnica.

35 La composición farmacéutica puede administrarse de una o más maneras dependiendo de si se selecciona tratamiento local o sistémico, y del área para tratar. La administración puede realizarse por vía tópica (incluyendo vía oftálmica, vía vaginal, vía rectal, vía intranasal), por vía oral, por inhalación, o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso o inyección intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

40 Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pero sin limitación lociones, pomadas, geles, cremas, supositorios, gotas, líquidos, pulverizaciones y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos, bases acuosas, de polvo u oleosas, espesantes farmacéuticos convencionales y similares.

Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, sobrecitos, cápsulas o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, diluyentes, saporíferos, adyuvantes de dispersión, emulsionantes o aglutinantes.

45 Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir pero sin limitación soluciones estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados.

50 La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad de la afección para tratar, pero normalmente será de una o más dosis por día, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses o hasta que se efectúe una cura o se consiga una disminución de la patología. Los expertos habituales en la materia pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. El régimen de administración de liberación lenta puede ser ventajoso en algunas aplicaciones.

Las células para expandir pueden presentarse *ex vivo*.

Como se usa en el presente documento la expresión “*ex vivo*” se refiere a células retiradas de un organismo vivo y se propagan fuera del organismo (por ejemplo, en un tubo de ensayo). Como se usa en el presente documento, la expresión “*ex vivo*”, sin embargo, no se refiere a células que se sabe que se propagan solamente *in vitro*, tales como diversas líneas celulares (por ejemplo, HL-60, HeLa, etc.).

- 5 Proporcionar a las células crecidas *ex vivo* las condiciones para proliferación celular incluye proporcionar a las células nutrientes y preferentemente una o más citocinas. De nuevo, la reducción de la capacidad de las células en la utilización de metales de transición, tales como Cobre, se efectúa mediante un quelante de metales de transición adecuado y/o iones de Cinc.

10 Las concentraciones finales del quelante y/o iones de Cinc pueden estar, dependiendo de la aplicación específica, en los intervalos micromolares o milimolares. Por ejemplo, de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , preferentemente de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50 mM, más preferentemente de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 40 mM.

15 El quelante puede ser un agente quelante de poliaminas tal como, pero sin limitación, etilendiamina, dietilentriamina, trietilentetramina, trietilendiamina, tetraetilenpentamina, aminoetiletanolamina, aminoetilpiperacina, pentaetilenhexamina, clorhidrato de trietilentetramina, clorhidrato de tetraetilenpentamina, clorhidrato de pentaetilenhexamina, tetraetilpentamina, captopril o penicilamina, preferentemente tetraetilpentamina. El quelante también puede ser un péptido adecuado que tenga un motivo de unión a metales de transición. Se conoce la alta afinidad de los quelantes enumerados anteriormente hacia iones de cobre. Sin embargo, estos quelantes tienen una afinidad sustancial también hacia otros metales de transición (39).

20 De acuerdo con otra realización preferida de la invención las citocinas son citocinas de actuación temprana, tales como, pero sin limitación, factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombopoyetina e interleucina-3 y/o citocinas de actuación tardía, tales como, pero sin limitación, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.

25 Las células pueden ser de cualquier linaje celular incluyendo, pero sin limitación, células hematopoyéticas, células neurales, células oligodendrocíticas, células cutáneas, células hepáticas, células musculares, células óseas, células mesenquimales, células pancreáticas, condrocitos y células del estroma.

Dependiendo de la aplicación, las células hematopoyéticas pueden obtenerse para expansión *ex vivo* de acuerdo con el procedimiento de la presente invención de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical neonatal.

30 Preferentemente, las células hematopoyéticas se enriquecen con respecto a células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hemopoyéticas (es decir, células madre). El enriquecimiento de la fracción de células madre puede efectuarse por clasificación celular, como se conoce bien en la técnica.

35 Las células expandidas de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento pueden ser células madre no diferenciadas o células progenitoras comprometidas. Se conocen células madre para muchos linajes celulares. Estas células se caracterizan por ser las células más indiferenciadas del linaje. Las células progenitoras, por otro lado, son más diferenciadas, puesto que ya están comprometidas a una ruta de diferenciación dentro del linaje celular.

40 Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento del trasplante de células hemopoyéticas. El procedimiento incluye las siguientes etapas. En primer lugar, se obtienen células hemopoyéticas para trasplantar de un donante. En segundo lugar, se proporciona a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, reducción de una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células. Finalmente, las células se trasplantan a un paciente. En caso de un trasplante autólogo el donante y el paciente son un individuo único. Las células pueden obtenerse de sangre periférica, médula ósea o sangre del cordón umbilical neonatal. Preferentemente se enriquecen, con respecto a células madre o células progenitoras (por ejemplo, por clasificación celular).

45 Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento para transducir (transfectar, transformar) células madre con un exógeno (transgén). El procedimiento incluye las siguientes etapas. En primer lugar, se obtienen células madre para transducir. En segundo lugar, se proporciona a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células. En tercer lugar, las células se transducen con el exógeno. Se conocen bien en la técnica procedimientos de transducción y no requieren descripción adicional en el presente documento. Se encuentran ejemplos de protocolos de transducción en muchos manuales de laboratorio incluyendo Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. La transducción se efectúa preferentemente por un vector que incluye el exógeno.

Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento de inmunoterapia adoptiva. El

procedimiento incluye las siguientes etapas. En primer lugar, se obtienen células hemopoéticas progenitoras de un paciente. En segundo lugar, se proporcionan a las células *ex vivo* condiciones para proliferación celular y, a la vez, para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez diferenciación de las células. Finalmente, las células se trasplantan al paciente.

Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento de movilización de células madre de médula ósea a la sangre periférica de un donante para recoger las células. El procedimiento incluye las siguientes etapas. En primer lugar, se administra al donante un agente para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de células madre, inhibiendo a la vez diferenciación de las células madre. En segundo lugar, las células se recogen por leucoferesis. Se prefiere administrar al donante una citocina (citocina de actuación temprana y/o tardía) para potenciar la movilización. El agente es preferentemente un quelante de metales de transición y/o iones de Cinc.

Se describe adicionalmente en el presente documento la desaceleración de maduración/diferenciación de células precursoras eritroides para el tratamiento de pacientes  $\beta$ -hemoglobinopáticos. El procedimiento incluye la etapa de administrar al paciente un agente para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de células madre, inhibiendo a la vez la diferenciación de las células madre, de modo que tras la retirada natural del agente del cuerpo, las células madre experimentan maduración acelerada dando como resultado producción elevada de hemoglobina fetal.

Se describe adicionalmente en el presente documento una preparación de células cultivadas *ex vivo* terapéutica. La preparación incluye células *ex vivo* propagadas en presencia de un agente para reducir una capacidad de las células en la utilización de metales de transición, en particular Cobre, expandiendo de este modo una población de las células, inhibiendo a la vez diferenciación de las células.

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

## EJEMPLO 1

### ***Procedimientos experimentales***

**Selección de células CD<sub>34</sub>**: Se aplicaron en capas células de "capa leucocítica" de sangre periférica de una unidad sanguínea completa, células de sangre periférica obtenidas después de leucoferesis o células de sangre del cordón umbilical en Ficoll-Hypaque (densidad 1,077 g/ml) y se centrifugaron a 1.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. La capa interfase de células mononucleares se recogió, se lavó tres veces con solución salina tamponada con fosfato sin Ca/Mg que contenía albúmina de suero bovino 1% (BSA). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpo anti-CD<sub>34</sub> monoclonal murino (0,5  $\mu$ g/10<sup>5</sup> células mononucleares) y se aislaron a continuación usando el aparato miniMACS (Miltenyi-Biotec, Bergisch, Gladbach, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

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

**Evaluaciones de potencial de clonación**: El potencial de clonación de las células desarrolladas en el cultivo líquido se ensayó, a diferentes intervalos, en medio semisólido. Las células se lavaron y se sembraron en placas de 35 mm en medio alfa que contenía metilcelulosa complementado con factores de crecimiento recombinantes (SCF, G-CSF, GM-CSF y EPO). Después de 2 semanas de incubación, los cultivos se puntuaron con un microscopio invertido. Las colonias se clasificaron como blastos, mixtas, eritroides, mieloides y megacariocíticas, de acuerdo con su composición celular.

**Evaluación morfológica**: Para caracterizar las poblaciones de cultivo resultantes, se depositaron alícuotas de células en un portaobjetos de vidrio (citocentrífuga, Shandon, Runcorn, Reino Unido), se fijaron y se tiñeron en May-Grunwald Giemsa. Se tiñeron otras alícuotas por bencidina para hemoglobina intracelular.

**Tinción de inmunofluorescencia**: A diferentes intervalos, se ensayaron células de los cultivos líquidos con respecto al antígeno CD<sub>34</sub>. Las alícuotas se recogieron, lavaron e incubaron en hielo con anticuerpo monoclonal anti CD<sub>45</sub> marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti CD<sub>34</sub> marcado con PE (HPCA-2) o Ig de ratón de control marcado con PE. Después de la incubación, se lisaron glóbulos rojos con solución de lisado, mientras que las células restantes se lavaron y se analizaron por citometría de flujo.

**Citometría de flujo**: Las células se analizaron y clasificaron usando citómetro de flujo FACStar<sup>plus</sup> (Becton-

Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA). Las células se pasaron a una tasa de 1.000 células/segundo a través de una boquilla de 70 mm, usando solución salina como el fluido de envoltura. Un haz de láser de argón de 488 nm a 250 mW actuó como la fuente de luz para excitación. Se midió la fluorescencia verde (derivada de FITC) usando un filtro de paso de banda de 530±30 nm y fluorescencia roja (derivado de PE), usando un filtro de banda de 575+26 nm. Los PMT se ajustaron a la tensión apropiada. Se aplicó amplificación logarítmica para mediciones de fluorescencia y amplificación lineal para dispersión de la luz directa. Se analizaron al menos 10<sup>4</sup> células.

**EJEMPLO 2**

**Resultados experimentales**

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

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

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

Citocinas de actuación tardía: factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y eritropoyetina (EPO).

**Efectos de TEPA en la proliferación y capacidad de clonación de cultivos de CD<sub>34</sub><sup>+</sup> a corto plazo:** La adición de TEPA a células de CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cultivadas con dosis bajas de citocinas de actuación temprana dio como resultado un aumento significativo del número de células totales, en el número de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (medidas por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos marcados con fluorescencia, Figura 2) y en capacidad de clonación celular (medida sembrando en placas alícuotas de cultivo en medio semisólido y puntuando las colonias que se desarrollaban dos semanas después, Figura 1), en comparación con cultivos complementados solamente con citocinas. Las colonias que se desarrollaron en medio semisólido en presencia de TEPA fueron de fenotipo mieloide, eritroide y mixto.

Los efectos de TEPA se evaluaron adicionalmente en cultivos complementados con dosis altas de citocinas tempranas (Tabla 1) o con una combinación de citocinas de actuación temprana y tardía (Figura 3). Los resultados indicaron que TEPA aumentó significativamente la capacidad de clonación y el porcentaje de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> en esos cultivos. Con respecto al número de células totales se aumentó por TEPA en cultivos complementados con citocinas tempranas (Tabla 1; Figura 2), mientras que en cultivos complementados con citocinas tanto tempranas como tardías, TEPA provocó una inhibición marginal (Figura 3).

**TABLA 1**

<b>El efecto a corto plazo de TEPA en células CD<sub>34</sub></b>					
TEPA	IL-3	Células/ml (x10 <sup>4</sup> )	Células CD <sub>34</sub> (%)	Colonias (Por 1x10 <sup>3</sup> células de inicio)	Expansión de UFC (veces)
-	-	1	1	16	0,3
+	-	2	11,5	140	2,8
-	+	5	5	165	3,3
+	+	11	20	850	17

Se sembraron en placas células CD<sub>34</sub> derivadas de sangre del cordón umbilical en cultivo líquido en presencia de: FL - 50 ng/ml, SCF - 50 ng/ml, IL-6 - 50 ng/ml, con o sin IL-3 - 20 ng/ml, con o sin TEPA - 10 μM. El día 7, se determinó el porcentaje de células CD34 y el número de células totales. Se ensayaron alícuotas equivalentes a 1 x 10<sup>3</sup> células de inicio los días 0 y 7 con respecto a células formadoras de colonias (UFC) clonando en medio semisólido. La expansión de UFC representa la relación de UFC presente el día 7 y UFC presente el día 0.

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

Después de tres semanas en cultivo, hubo una reducción brusca de la capacidad de clonación en cultivos complementados solamente con citocinas, mientras que los cultivos tratados con TEPA en combinación con citocinas mantuvieron alta capacidad de clonación, que fue incluso mayor que la de los cultivos a corto plazo.

5 **El efecto de TEPA en la maduración de células hematopoyéticas:** El efecto de TEPA en la maduración de células hematopoyéticas se ensayó en varios modelos:

10 Células eritroleucémicas de ratón (MEL): Las células MEL son células de tipo eritroblástico. Después del tratamiento con varios compuestos químicos (inductores de diferenciación) las células experimentan diferenciación eritroide y acumulan hemoglobina. Las células MEL se cultivaron en presencia del inductor de diferenciación hexametileno bisacetamida (HMBA) y los quelantes TEPA o Captopril. El día 3 del cultivo, el número total de células y el porcentaje de células que contenían hemoglobina se determinaron (Tabla 2). Los resultados indicaron que tanto TEPA como captopril inhibían la diferenciación inducida por HMBA de células MEL.

15 Cultivos de células eritroides humanas: Se dejaron crecer células eritroides humanas normales de acuerdo con el procedimiento de cultivo líquido de dos fases, esencialmente como se describe en las referencias 23-26. En la primera fase, se incubaron células mononucleares de sangre periférica en presencia de factores de crecimiento temprano durante 5-7 días. En la segunda fase, estos factores se reemplazaron con factor de proliferación/diferenciación específico eritroide, eritropoyetina.

20 Los cultivos se complementaron con TEPA al inicio de la segunda fase. El número de células totales y el porcentaje de células que contienen hemoglobina se determinaron después de 14 días. Los resultados (Figura 5) mostraron que en presencia de TEPA hubo una reducción brusca de las células que contenían hemoglobina, mientras que el número total de células se redujo solo ligeramente.

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

TABLA 2

<b>El efecto de TEPA y captopril en el crecimiento y diferenciación de células de eritroleucemia</b>		
	Células/ml ( $\times 10^4$ )	Células Positivas para Bencidina (%)
Control	31	<1
HMBA	32	46
HMBA + TEPA 5 $\mu$ M	35	24
HMBA + TEPA 10 $\mu$ M	35	16
HMBA + TEPA 20 $\mu$ M	47	16
HMBA + Captopril 20 $\mu$ M	34	29
HMBA + Captopril 40 $\mu$ M	34	12

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

30 **Cultivos iniciados con CD<sub>34</sub><sup>+</sup>:** Se mantuvieron cultivos líquidos a largo plazo iniciados con células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> con diferentes cócteles de citocinas. La mitad de los cultivos se complementaron continuamente con TEPA. Para ensayar el estado de diferenciación celular, se tiñeron preparaciones de cytospin con May-Grunwald Giemsa (Figuras 6a-d). Los resultados mostraron que los cultivos que se mantuvieron durante 4-5 semanas sin TEPA contenían solamente células completamente diferenciadas, mientras que con TEPA los cultivos contenían, además de células completamente diferenciadas, un subconjunto de 10% - 40% de células de tipo blasto indiferenciadas.

35 Estos resultados sugieren fuertemente que TEPA induce un retardo en la diferenciación de células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> que da como resultado proliferación prolongada y acumulación de células progenitoras tempranas en cultivos *ex vivo* a largo plazo.

**Mecanismo de actividad de TEPA:** Para determinar si TEPA afecta a las células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> mediante empobrecimiento

de metales de transición, tales como Cobre, se tomaron dos enfoques.

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

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

- 10 El cinc, que se sabe que interfiere en el metabolismo de los metales de transición, por ejemplo, el metabolismo del Cobre, expande la capacidad de clonación de los cultivos por sí mismo. Este efecto fue aun más pronunciado en presencia tanto de Cinc como de TEPA (Figura 10).

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

Por el contrario, los cultivos no tratados con TEPA, de control, dejaron de proliferar y generar cUFC y sus células experimentaron diferenciación muchos más temprano.

- 20 Por lo tanto, TEPA y otros quelantes de metales de transición mantienen cultivos a largo plazo inhibiendo/retardando la diferenciación celular a través de quelación de metales de transición, en particular Cobre.

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

### 25 EJEMPLO 3

- Se purificaron células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> derivadas de sangre del cordón umbilical neonatal humana por procedimiento inmunomagnético y después se cultivaron en medio líquido complementado con citocinas con o sin quelantes de metales de transición. A intervalos semanales, los cultivos se semidespoblaron retirando la mitad del contenido de cultivo (sobrenadante y células) y reemplazándolo con medio nuevo, citocinas y los quelantes. En las semanas indicadas el contenido celular de los cultivos se cuantificó con respecto a células totales (por un procedimiento microscópico/hemocitométrico manual), con respecto a células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> (por inmunocitometría de flujo) y con respecto a células clonogénicas (clonando las células en medio semisólido complementado con citocinas). Los cultivos se iniciaron con 1 x 10<sup>4</sup> células, 50-80% de las cuales fueron CD<sub>34</sub><sup>+</sup> y 25-50% de las cuales fueron cUFC. Los resultados presentados en las Figuras 11 a 24 se calcularon por 1 x 10<sup>4</sup> células de inicio (los números se multiplicaron por los factores de dilución).

- La Figura 11 muestra el efecto de TEPA en cultivos de CD<sub>34</sub> a largo plazo. Los cultivos iniciados con células CD<sub>34</sub> en medio líquido complementado con citocinas de actuación temprana (en ausencia de células del estroma) pudieron mantenerse por TEPA durante un tiempo largo (> 6 semanas). En tales cultivos, TEPA soportó, en combinación con las citocinas, el mantenimiento y expansión de células clonogénicas (cUFC): Los cultivos se iniciaron con 2,5 x 10<sup>3</sup> cUFC. Tras la terminación después de 6 semanas, los cultivos tratados con TEPA contenían 300 x 10<sup>3</sup> cUFC, (es decir, una expansión de 120 veces) mientras que los cultivos de control no contenían cUFC.

- Las Figuras 12-14 muestran el efecto de TEPA en la proliferación celular, cUFC y frecuencia de cUFC en presencia de diferente combinación de citocinas tempranas. Se descubrió que la combinación de las citocinas de actuación temprana TPO, SCF, FLT, IL-6 y TEPA era la combinación óptima para el mantenimiento y expansión a largo plazo de células con potencial clonogénico.

La Figura 15 muestra el efecto de G-CSF y GM-CSF en la frecuencia de cUFC de cultivos de CD<sub>34</sub> complementados con TEPA y de control. La complementación de los cultivos con las citocinas de actuación tardía G-CSF y GM-CSF, que estimulan la diferenciación celular, dio como resultado pérdida rápida de células clonogénicas. Este efecto estimulador de diferenciación se bloquea por TEPA.

- 50 Las Figuras 16-17 muestran el efecto de cambio de TEPA + medio completo o parcial en proliferación celular a largo plazo (Figura 16) y producción de cUFC (Figura 17). Los resultados obtenidos indican que para mantener expansión máxima, TEPA debería reemplazarse completamente, al menos, a intervalos semanales.

La Figura 19 muestra el efecto de adición retardada de TEPA en la frecuencia de cUFC. Resulta evidente que la exposición temprana de células CD<sub>34</sub> a TEPA fue crucial para mantenimiento a largo plazo y expansión de cUFC, lo

que sugiere que TEPA afecta a la diferenciación de progenitores en diversas etapas de diferenciación.

La Figura 20 muestra el efecto de preincubación a corto plazo con una citocina sencilla en producción de cUFC a largo plazo. Los resultados indican que LTC-CFC se preservan más en cultivos tratados con TEPA cuando se complementan durante las primeras 24 horas con una citocina sencilla en lugar del complemento completo de citocinas, lo que sugiere que en las condiciones anteriores las células se bloquean de forma más eficaz.

Las Figuras 21a-b muestran el efecto de agentes quelantes de poliaminas en cultivos de células CD<sub>34</sub>. Los agentes quelantes de poliaminas mantuvieron la proliferación celular y expandieron cUFC durante cultivos a largo plazo. Entre los compuestos ensayados, se descubrió que las poliaminas de cadena larga, TEPA y PEHA, eran más eficaces que las poliaminas de cadena corta.

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

La Figura 23a-b muestra el efecto del Cinc en cultivos de células CD<sub>34</sub>. El Cinc, que se sabe que interfiere en el metabolismo de metales de transición, en particular Cobre, indicó el efecto de los agentes metálicos en cultivos a largo plazo, pero en menor grado que los quelantes en sí mismos.

Por lo tanto, la expansión *ex vivo* de células progenitoras hematopoyéticas está limitada por la progresión de estas células a células diferenciadas que no se dividen. Este proceso de diferenciación puede retardarse cultivando las células progenitoras en capa de células del estroma. Puesto que el estroma soporta la proliferación celular continua y generación a largo plazo de cUFC, se cree que el estroma causa un efecto antidiferenciación en las células progenitoras.

Los inventores han desarrollado un nuevo sistema que mantiene proliferación celular continua y generación a largo plazo de cUFC en cultivos sin estroma (Figura 11) El sistema combina el uso de citocinas de actuación temprana, tales como factor de células madre (SCF), FLT3, interleucina-6 (IL-6), trombopoyetina (TPO) con o sin interleucina-3 y agentes quelantes de metales de transición (Figuras 12-14). Las citocinas tempranas soportan la supervivencia y proliferación de los progenitores con estímulos reducidos para diferenciación en comparación con citocinas de actuación tardía, tales como G-CSF y GM-CSF (Figura 15). Los quelantes inhiben la diferenciación a través de quelación de metales de transición, en particular Cobre. El cambio de medio completo a intervalos semanales, en comparación con cambio parcial, mejoró el mantenimiento de LTC-CFC, lo que sugiere que el complejo de metales de transición-TEPA, por ejemplo, complejo de Cobre-TEPA, puede no ser estable (Figuras 16-17).

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

Aunque se obtuvieron resultados óptimos cuando se añadió TEPA el día 1 fue ventajoso añadir el complemento completo de citocinas el día 2. Por lo tanto, los cultivos tratados con TEPA que se complementaron durante 1 día con solamente una citocina, por ejemplo, FLT3, seguido de adición de las otras citocinas (SCF, TPO e IL-3) se mantuvieron durante más tiempo que los cultivos en los que todas las citocinas se añadieron el día 1 (Figura 20). Los inventores presentan la hipótesis de que puesto que la diferenciación celular se conduce por las citocinas y depende de Cobre y otros metales de transición, la inhibición de la diferenciación requiere empobrecimiento de los mismos antes de exposición al complemento completo de citocinas. Una citocina sencilla no soporta activación rápida (proliferación y diferenciación) pero mantiene la viabilidad celular, permitiendo de este modo que la TEPA quele eficazmente los metales de transición en células CD<sub>34</sub> indiferenciadas en reposo antes de su activación.

Después de la exploración, se ha descubierto que diversos agentes quelantes soportan proliferación celular continua y generación a largo plazo de cUFC y retardan la diferenciación celular. Entre ellos están las poliaminas tales como, pero sin limitación TEPA, EDA, PEHA y TETA (Figuras 21a-b) o quelantes tales como, pero sin limitación, penicilamina (PEN) y captopril (CAP) (Figuras 22a-b). El cinc que interfiere con el metabolismo de metales de transición (en particular Cobre) también soportó LTC-CFC (Figuras 23a-b).

#### EJEMPLO 4

Se describe adicionalmente en el presente documento un procedimiento de conservación de células madre, tales como, pero sin limitación, células madre derivadas de sangre del cordón umbilical, células madre derivadas de sangre periférica y células madre derivadas de médula ósea. El procedimiento se efectúa manipulando la célula madre mientras se recoge, aísla y/o almacena, en presencia de un quelante de metales de transición, por ejemplo, TEPA.

Se recogieron y almacenaron células derivadas de sangre del cordón umbilical (no separadas) durante 24 horas, a 4 °C, en presencia o ausencia de TEPA 10 μM. Se separaron después células CD<sub>34</sub><sup>+</sup> usando tampón PBS-TEPA 10 μM o tampón de PBS sin TEPA, respectivamente. Después, las células se dejaron crecer en cultivos a largo plazo en presencia de TEPA 10 μM.

Los resultados indicaron que los cultivos que se iniciaron con células que se manipularon en presencia de TEPA se expandieron durante 8 semanas, mientras que los cultivos iniciados a partir de células almacenadas sin TEPA dejaron de expandirse después de solamente 5 semanas.

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

Estos resultados indican que la adición de un quelante de metales de transición, tal como TEPA, a las bolsas de recogida y los tampones de separación y lavado aumenta el rendimiento de las células madre y mejora su potencial para crecimiento a largo plazo, facilitando de este modo la captación a corto plazo y la repoblación a largo plazo después de trasplante de células hemopoyéticas "nuevas", crioconservadas o expandidas *ex vivo*.

10 Por lo tanto, se describen adicionalmente en el presente documento bolsas de recogida de células madre y tampones de separación y lavado complementados con una cantidad o concentración eficaz de quelante de metales de transición, que inhibe la diferenciación.

### Lista de referencias citadas

- 15 1. Van Epps DE, y col. Harvesting, characterization, and culture of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells* 20: 411, 1994.
2. Emerson SG. *Ex vivo* expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood* 87: 3082, 1996.
3. Brugger W, y col. Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *in vivo*. *N Engl J Med* 333: 283, 1995.
- 20 4. Williams SF, y col. Selection and expansion of peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood* 87: 1687, 1996.
5. Zimmerman RM, y col. Large-scale selection of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications. *J Hematotherapy* 5: 247, 1996.
- 25 6. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood* 82: 378, 1993.
7. Lebkowski JS, y col. Rapid isolation and serum-free expansion of human CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells. *Blood Cells* 20: 404, 1994.
8. Sandstrom CE, y col. Effects of CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cell selection and perfusion on *ex vivo* expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 86: 958, 1995.
- 30 9. Eiprs PG, y col. Retroviral infection of primitive hematopoietic cells in continuous perfusion culture. *Blood* 86: 3754, 1995.
10. Freedman AR, y col. Generation of T lymphocytes from bone marrow CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells *in vitro*. *Nature Medicine* 2: 46, 1996.
11. Heslop HE, y col. Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nature Medicine* 2: 551, 1996.
- 35 12. Protti MP, y col. Particulate naturally processed peptides prime a cytotoxic response against human melanoma *in vitro*. *Cancer Res* 56: 1210, 1996.
13. Rosenberg SA, y col. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 622, 1993.
- 40 14. Bernhard H, y col. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1099, 1995.
15. Fisch P, y col. Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens *ex vivo* from peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol* 26: 595, 1996.
16. Siena S, y col. Massive *ex vivo* generation of functional dendritic cells from mobilized CD<sub>34</sub><sup>+</sup> blood progenitors for anticancer therapy. *Expt Hematol* 23: 1463, 1996.
- 45 17. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD<sub>34</sub><sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) human hematopoietic cells: novel responses to FIT3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 183: 2551, 1996.
18. Schwartz RM, y col. *In vitro* myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors. *Blood* 78: 3155, 1991.
19. Verfaillie CM. Can human hematopoietic stem cells be cultured *in vivo*? *Stem Cells* 12: 466, 1994.
- 50 20. Haylock DN, y col. *Ex vivo* expansion and maturation of peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells into the myeloid lineage. *Blood* 80: 1405, 1992.
21. Brugger W, y col. *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 81: 2579, 1993.
22. Sato N, y col. *In vitro* expansion of human peripheral blood CD<sub>34</sub><sup>+</sup> cells. *Blood* 82: 3600, 1993.
- 55 23. Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid medium. *Blood* 73: 100, 1989.
24. Fibach E, Manor D, Treves A, Rachmilewitz EA. Growth of human normal erythroid progenitors in liquid culture: A comparison with colony growth in semisolid culture. *Internatl J Cell Clon* 9: 57, 1991.
25. Fibach E, Rachmilewitz EA. The two-step liquid culture - novel procedure for studying maturation of human normal and pathologic erythroid precursors. *Stem Cells* 11: 36, 1993.
- 60 26. Dalyot N, Fibach E, Rachmilewitz E, Oppenheim A. Adult and neonatal patterns of human globin gene expression are recapitulated in liquid cultures. *Exper Hematol* 20: 1141, 1992.

27. Banno S, y col. Anemia and neutropenia in elderly patients caused by copper deficiency for long-term enteral nutrition. *Rinsho-ketsueki* 35: 1276, 1994.
28. Wasa M, y col. Copper deficiency with pancytopenia during total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18: 190, 1994.
- 5 29. Zidar BL, Shadduck RK, Zeigler Z, Winkelstein A. Observation on the anemia and neutropenia of human copper deficiency. *Am J Hematol* 3: 177, 1977.
30. Hirase N, y col. Anemia and neutropenia in a case of copper deficiency: Role of copper in normal hematopoiesis. *Acta Haematol* 87: 195, 1992.
- 10 31. Percival SS, Layden-Patrice M. HL-60 cells can be made copper deficient by incubating with tetraethylenepentamine. *J Nutr* 122: 2424, 1992.
32. Percival SS. Neutropenia caused by copper deficiency: possible mechanisms of action. *Nutr Rev* 53: 59, 1995.
33. Bae B, Percival SS. Retinoic acid-induced HL-60 cell differentiation is augmented by copper supplementation. *J Nutr* 123: 997, 1993.
- 15 34. Bae B, Percival SS. Copper uptake and intracellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells. *J Nutr Biochem* 5: 457, 1994.
35. Alter BP. Fetal erythropoiesis in stress hemopoiesis. *Experimental Hematology* 7: 200, 1979.
36. Repair of myelin disease: Strategies and progress in animal models. *Molecular Medicine Today*. Dic. 1997. pp. 554-561.
- 20 37. Blau CA y col. Fetal hemoglobin in acute and chronic stage of erythroid expansion. *Blood* 81: 227, 1993.
38. Schechtez AN y col. Sickle cell anemia. In: *Molecular basis of blood diseases*. Stamatoyannaopoulos G, Nienhuis AW, Leder P y Majerus PW Eds. pp. 179-218, Saunders Philadelphia.
39. Ross JW y Frant MS. Chelometric indicators, titration with the solid state cupric ion selective electrode. *Analytical Chemistry* 41: 1900, 1969.
- 25 40. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 51 (2): 225-227, 1990.
41. Simon SR, y col. Copper deficiency and siberoblastic anemia associated with zinc ingestion. *Am J Hematol* 28 (3): 181-183, 1988.
42. Hoffman HN 2d, y col. Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* 94(2): 508-512, 1988.
43. Reeves PG, y col. High zinc concentrations in culture media affect copper uptake and transport in differentiated human colon adenocarcinoma cells. *J Nutr* 126(6): 1701-1712, 1996.
- 30 44. Tashiro Itoh T, y col. Metallothionein expression and concentrations of copper and zinc are associated with tumor differentiation in hepatocellular carcinoma. *Liver* 17(6): 300-306, 1997.
45. Cable EE, Isom HC. Exposure of primary rat hepatocytes in long-term DMSO culture to selected transition metals induces hepatocyte proliferation and formation of duct-like structures. *Hepatology* 26(6): 1444-1457, 1997.
- 35 46. Kizaki M, y col. Regulation of manganese superoxide dismutase and other antioxidant genes in normal and leukemic hematopoietic cells and their relationship to cytotoxicity by tumor necrosis factor. *Blood* 82(4): 1142-1150, 1993.
47. Brugnera E, y col. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res* 22(15): 3167-3173, 1994.
- 40 48. Heuchel R, y col. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J* 13(12): 2870-2875, 1994.
49. Palmiter RD. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(4): 1219-1223, 1994.
- 45 50. Hatayama T, y col. Regulation of hsp70 synthesis induced by cupric sulfate and zinc sulfate in thermotolerant HeLa cells. *J Biochem Tokyo* 114(4): 592-597, 1993.
51. Filvaroff E, y col. Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 269(34): 21735-21740, 1994.
52. Okazaki T, y col. Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of a 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem* 269(6): 4070-4077, 1994.]
- 50 53. Kim H, Lipscomb WN. Differentiation and identification of the two catalytic metal binding sites in bovine lens leucine aminopeptidase by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(11): 5006-5010, 1993.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una población de células madre hematopoyéticas expandida obtenida por cultivo *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal sembradas en un medio de cultivo que proporciona a dichas células madre condiciones para proliferación celular y en presencia de tetraetilenpentamina (TEPA), en la que dicho medio de cultivo comprende citocinas de actuación temprana; y
- 10 en la que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado (i) mayor proliferación de células madre prolongada; (ii) mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas; y (iii) mantenimiento de un mayor porcentaje de células madre de sangre del cordón umbilical indiferenciadas en su estado indiferenciado en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA,
- inhibiendo de este modo la diferenciación, permitiendo a la vez la expansión de dicha población de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical en dicho medio de cultivo,
- 15 y en la que dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical por lo tanto se expanden pero no se diferencian más en comparación con células madre de sangre del cordón umbilical sembradas *ex vivo* de las que se expandió dicha población de células madre y progenitoras hematopoyéticas expandida.
2. La población de células madre y progenitoras expandidas de la reivindicación 1, en la que dichas células madre sembradas se enriquecen con respecto a células hematopoyéticas progenitoras tempranas no diferenciadas.
3. La población de células madre de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas sembradas se enriquecen con respecto a células CD34+ hematopoyéticas.
- 20 4. La población de células madre de la reivindicación 1, en la que dichas citocinas de actuación temprana se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombopoyetina e interleucina-3.
5. La población de células madre de la reivindicación 1, en la que el medio de cultivo comprende adicionalmente citocinas de actuación tardía.
- 25 6. La población de células madre de la reivindicación 5, en la que dichas citocinas de actuación tardía se seleccionan del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.
7. La población de células madre y progenitoras expandidas de la reivindicación 1, en la que dichas células madre y progenitoras se transducen con un exogén.
- 30 8. Una composición farmacéutica que comprende la población de células madre y progenitoras de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un procedimiento para expandir células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal *ex vivo*, inhibiendo a la vez la diferenciación de dichas células madre y progenitoras, comprendiendo el procedimiento proporcionar a dichas células madre y progenitoras de sangre de cordón umbilical *ex vivo* condiciones para proliferación celular y tetraetilenpentamina (TEPA), en el que dichas condiciones para proliferación incluyen proporcionar citocinas de actuación temprana; y en el que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado (i) mayor proliferación prolongada; (ii) mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas (cUFC); y (iii) mantenimiento de un mayor porcentaje de células indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA; inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical *ex vivo*.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas citocinas de actuación temprana se seleccionan del grupo que consiste en factor de células madre, ligando de FLT3, interleucina-6, trombopoyetina e interleucina-3.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente proporcionar citocinas de actuación tardía.
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dichas citocinas de actuación tardía se seleccionan del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos y eritropoyetina.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas células madre y progenitoras hematopoyéticas son células hematopoyéticas tempranas y/o células progenitoras hematopoyéticas.
14. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una población de células hematopoyéticas enriquecidas con respecto a células madre hematopoyéticas.

15. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas células madre se enriquecen con respecto a células CD34+ hematopoyéticas.

16. Un procedimiento para transducir células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas expandidas con un exógeno, comprendiendo el procedimiento:

5 (a) expandir e inhibir diferenciación de células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical:

(i) proporcionando a dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical condiciones para proliferación celular, en las que las que dichas condiciones para proliferación celular comprenden proporcionar citocinas de actuación temprana,

10 (ii) poniendo en contacto dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical con tetraetilenpentamina (TEPA), en las que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado mayor proliferación prolongada; mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas (cUFC); y mantenimiento de un mayor porcentaje de células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA; inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras *ex vivo*; y

(b) transducir dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas expandidas con el exógeno.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que dicha transducción se efectúa por un vector que incluye el exógeno.

18. Un procedimiento para preparar células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas expandidas para trasplante a un receptor, comprendiendo el procedimiento:

(a) expandir e inhibir la diferenciación de dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical:

25 (i) proporcionando a dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical condiciones para proliferación celular, en las que dichas condiciones para proliferación celular comprenden proporcionar citocinas de actuación temprana;

30 (ii) poniendo en contacto dichas células madre y progenitoras con tetraetilenpentamina (TEPA), en las que dicha TEPA y dichas condiciones de proliferación dan como resultado mayor proliferación prolongada,

mayor expansión a largo de plazo de células clonogénicas (cUFC), y mantenimiento de un mayor porcentaje de células indiferenciadas en su estado indiferenciado, en comparación con células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal cultivadas en presencia de dichas condiciones de proliferación y en ausencia de TEPA, inhibiendo de este modo la diferenciación y expandiendo dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical *ex vivo*; y

(b) aislar dichas células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas expandidas.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una población de células hematopoyéticas enriquecidas con respecto a células madre hematopoyéticas.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dichas células madre hematopoyéticas se enriquecen con respecto a células CD34+ hematopoyéticas.

21. Un procedimiento de conservación de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas que comprende poner en contacto las células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical neonatal indiferenciadas con tetraetilenpentamina (TEPA); y en el que dicho contacto se realiza en al menos una de las etapas de recoger, aislar y almacenar las células madre y progenitoras de sangre del cordón umbilical indiferenciadas.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dichas células madre y progenitoras son células madre hematopoyéticas.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que dichas células madre hematopoyéticas se enriquecen con respecto a células CD34+.

24. Una bolsa de recogida de células madre, complementada con una cantidad de tetraetilenpentamina (TEPA) suficiente para inhibir la diferenciación de una población de células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre

del cordón umbilical indiferenciadas, en la que dichas células madre son células madre y progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical indiferenciadas.

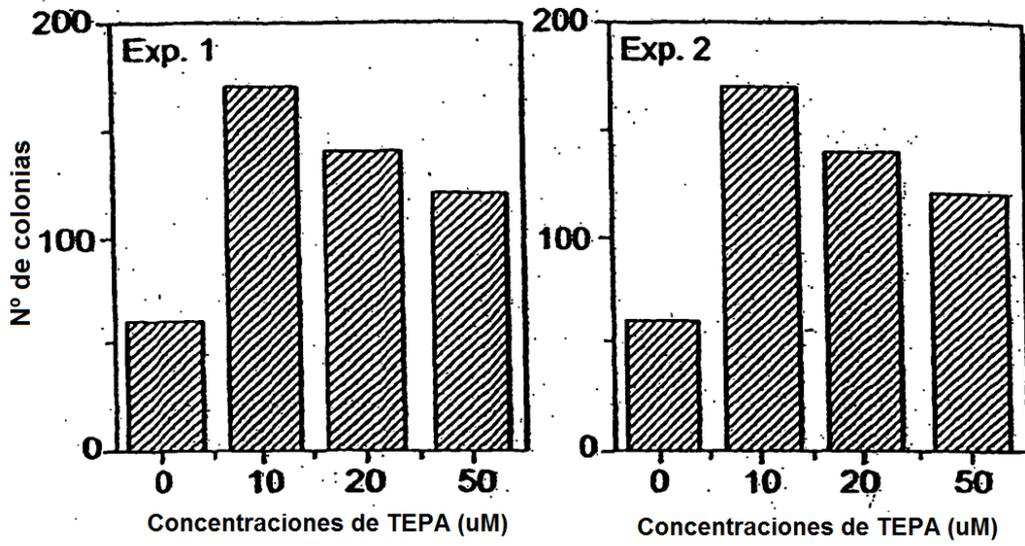


Fig. 1

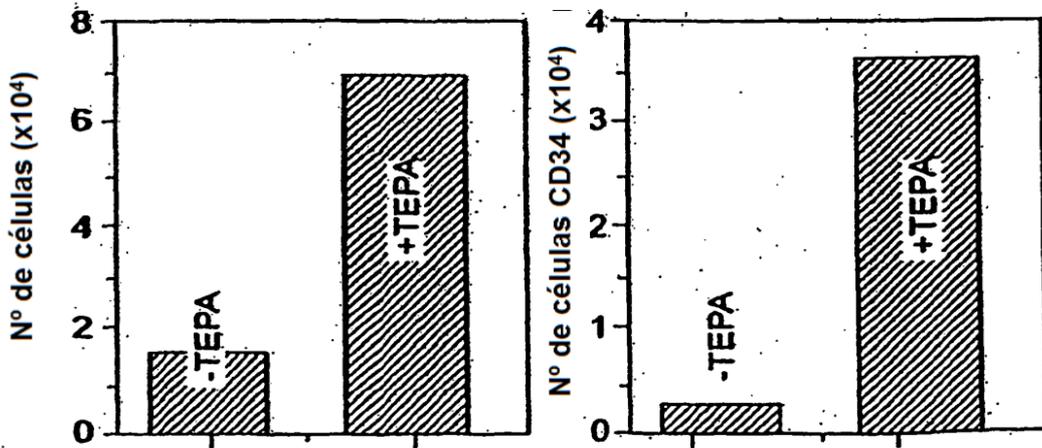


Fig. 2

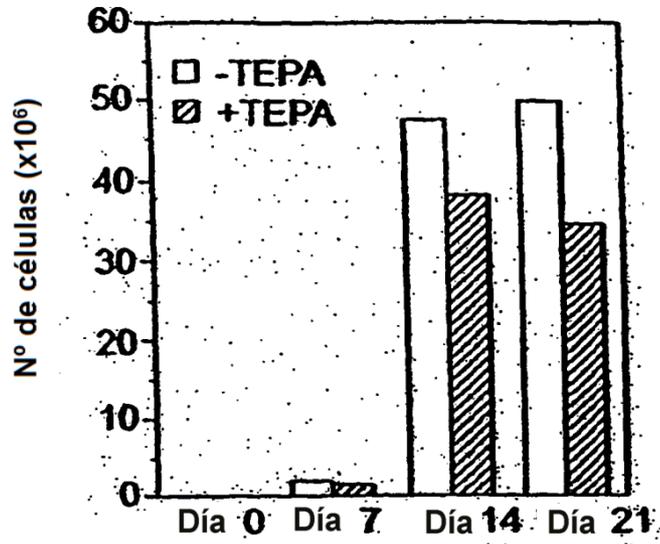


Fig. 3a

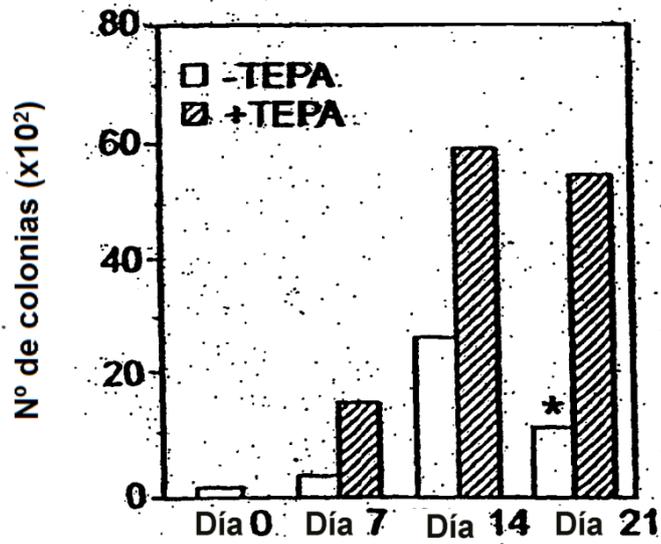


Fig. 3b

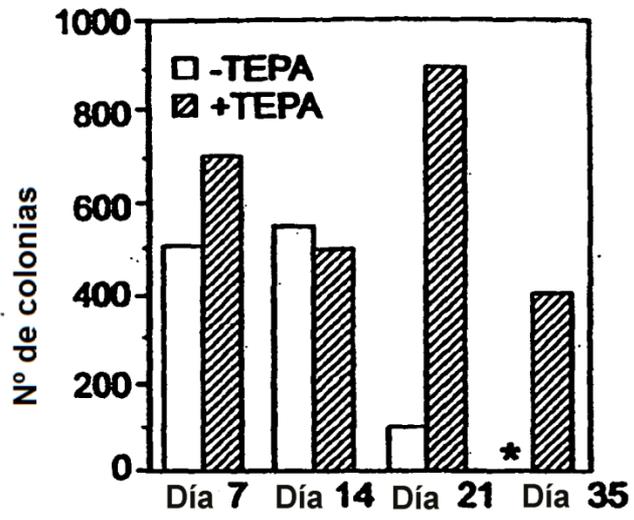


Fig. 4a

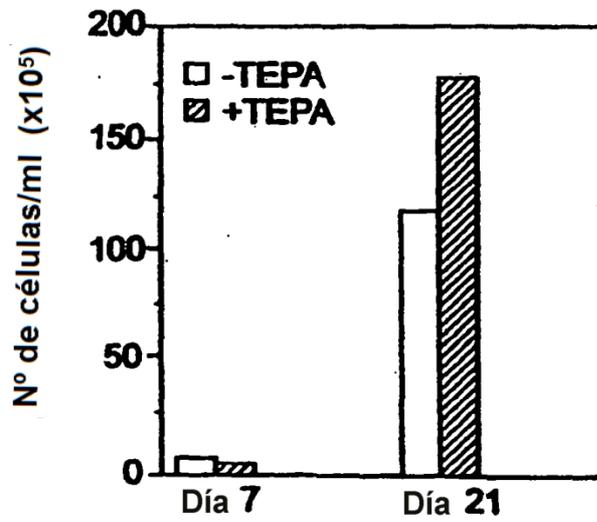


Fig. 4b

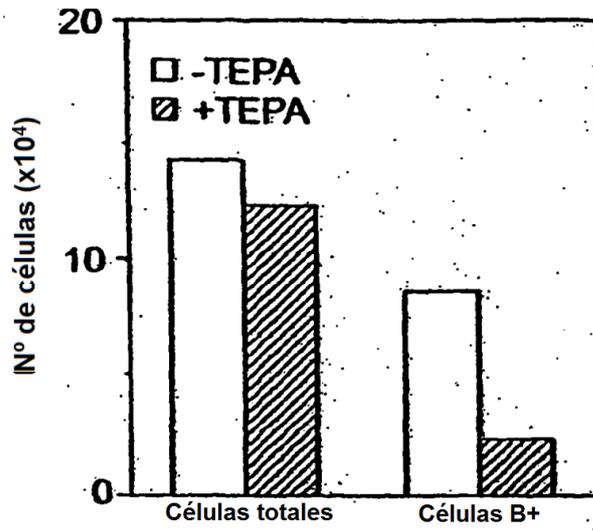


Fig. 5



Fig. 6a

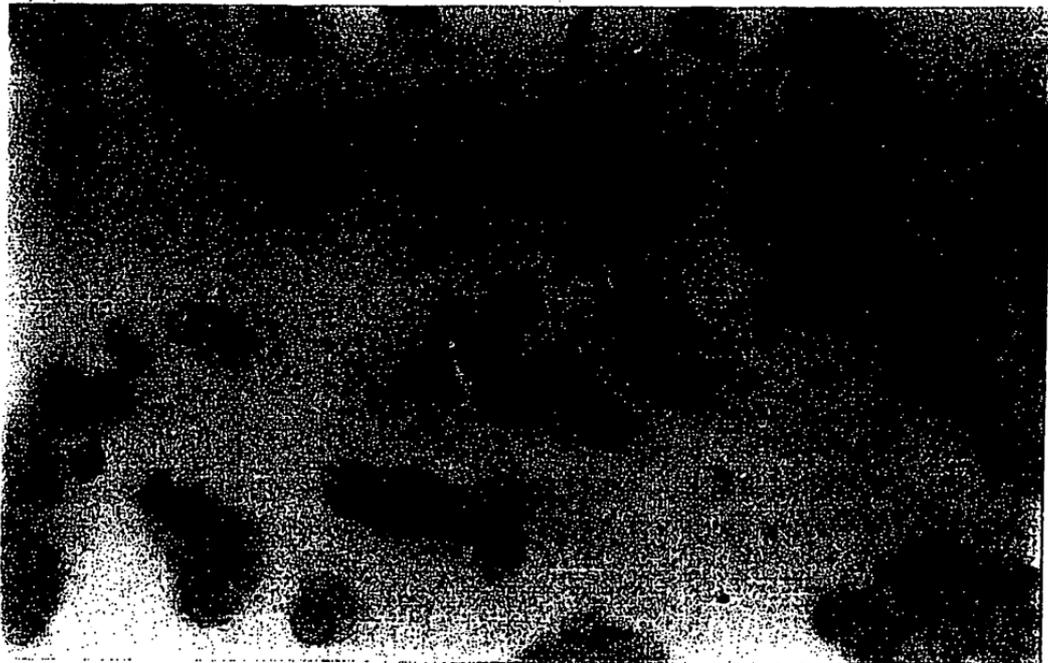


Fig. 6b



Fig. 6c

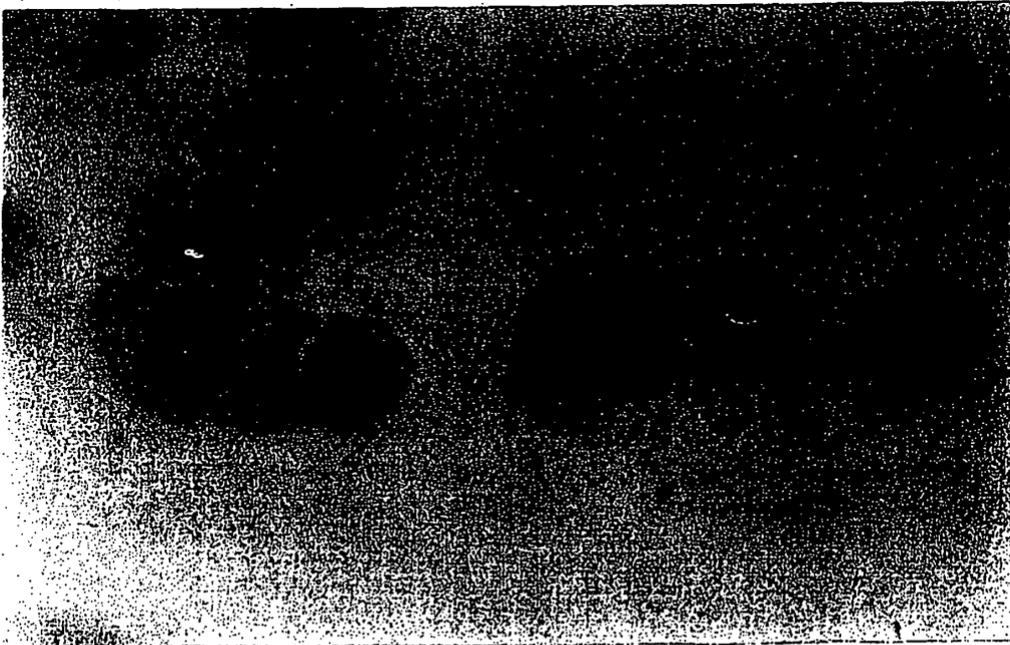


Fig. 6d

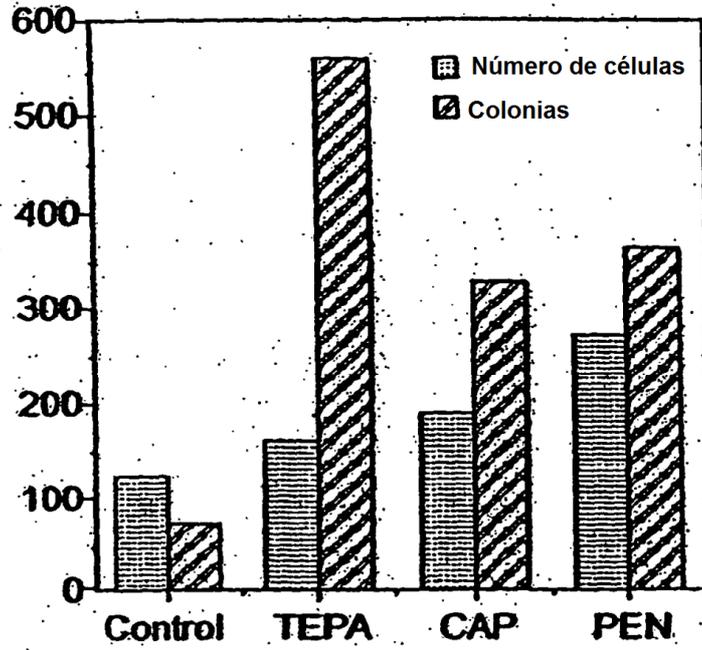


Fig. 7

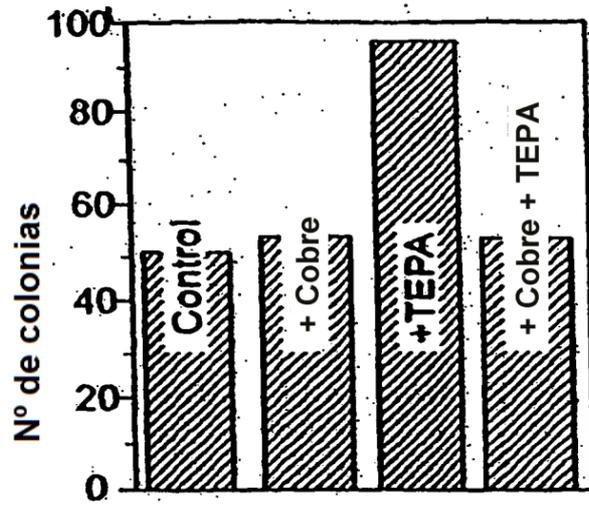


Fig. 8a

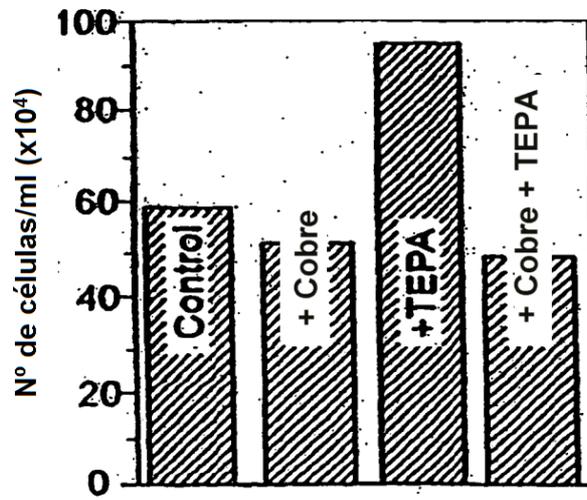


Fig. 8b

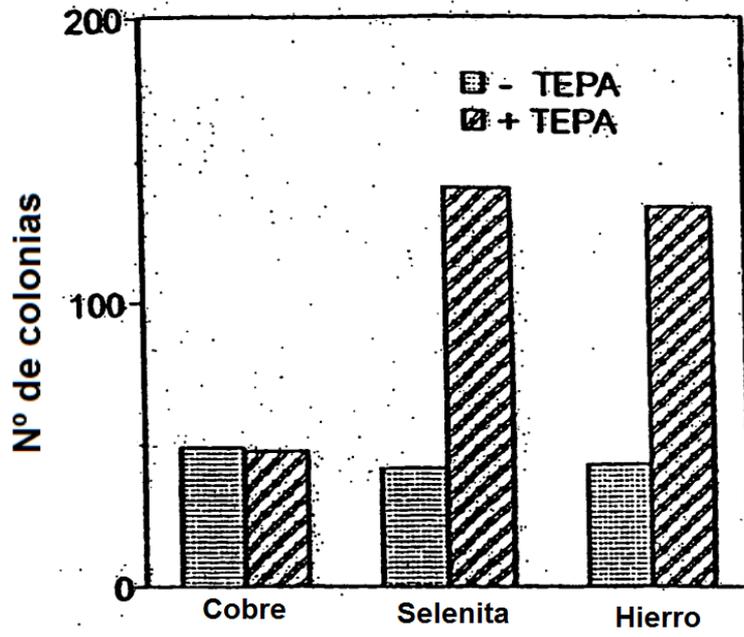


Fig. 9

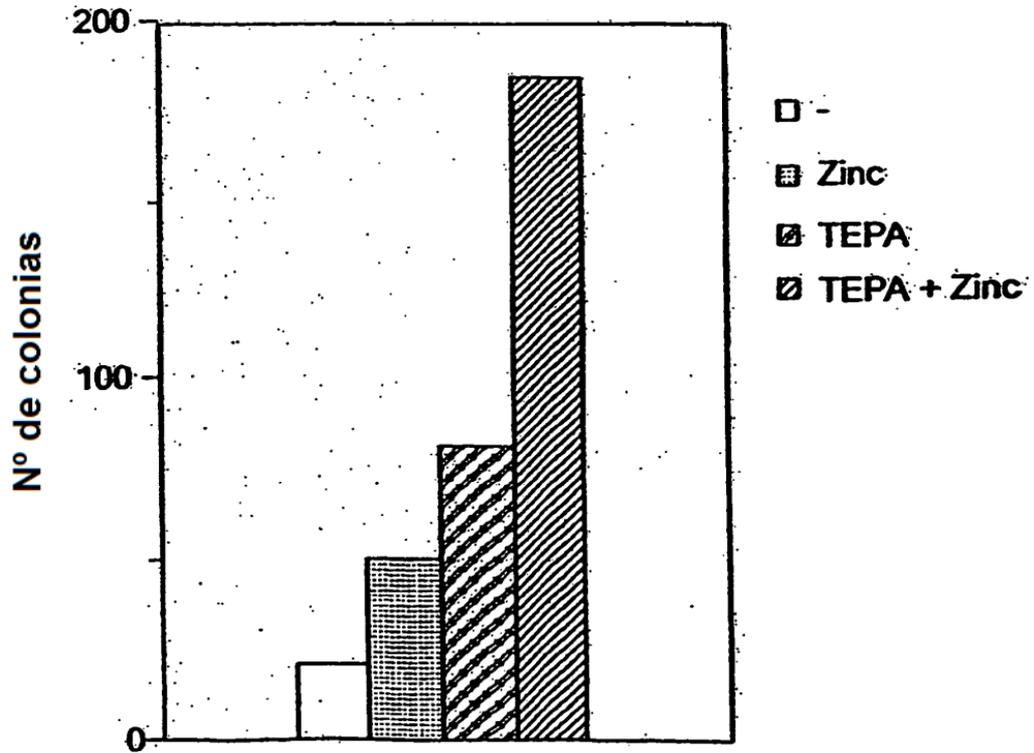


Fig. 10

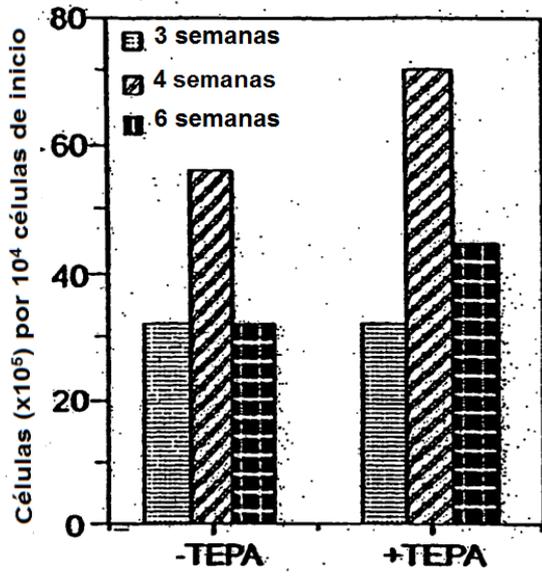


Fig. 11a

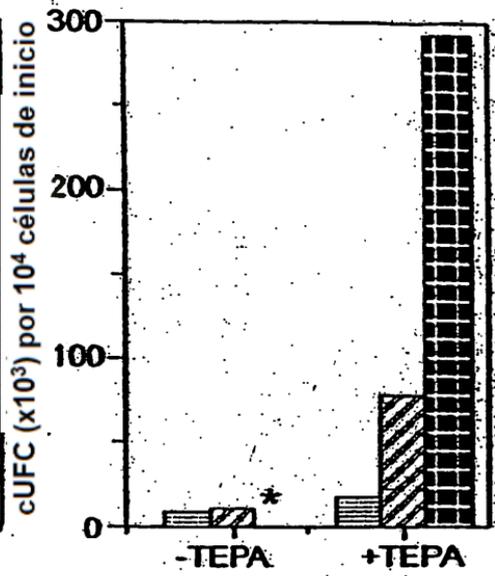


Fig. 11b

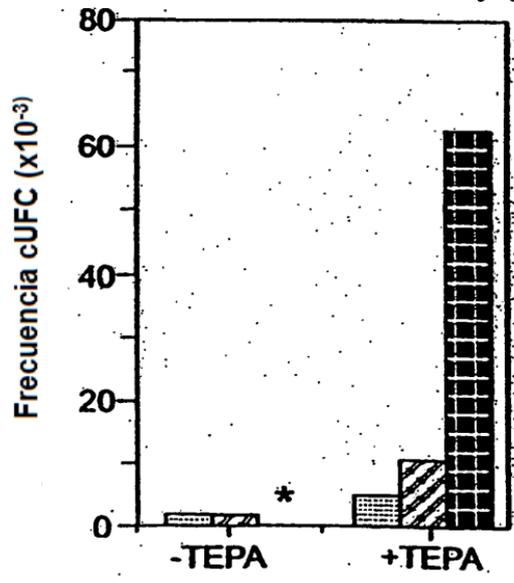


Fig. 11c

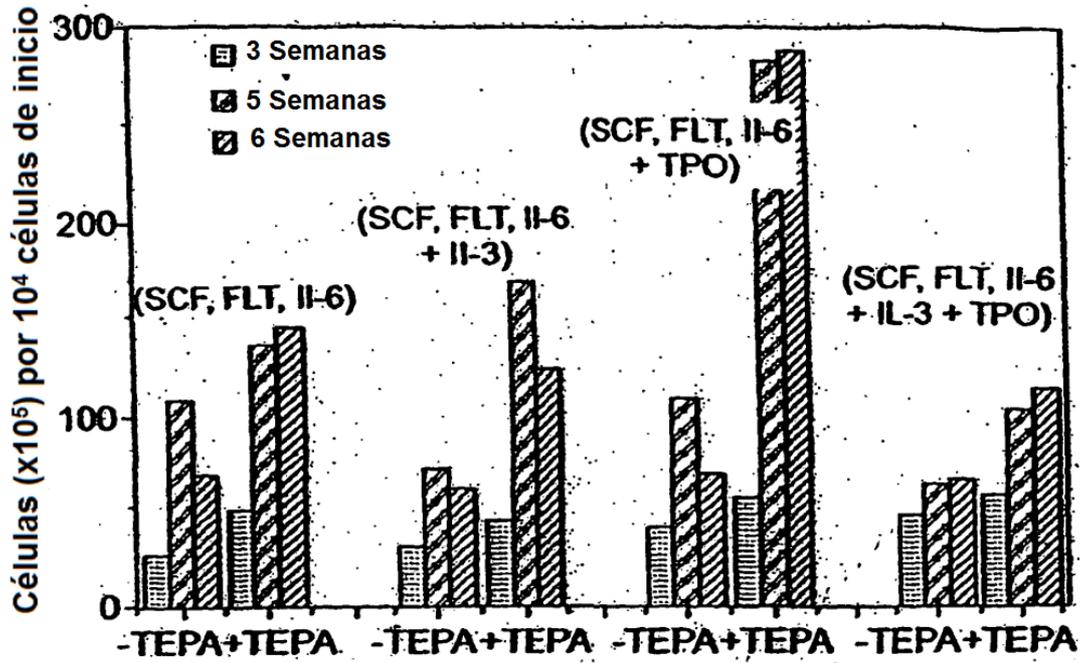


Fig. 12

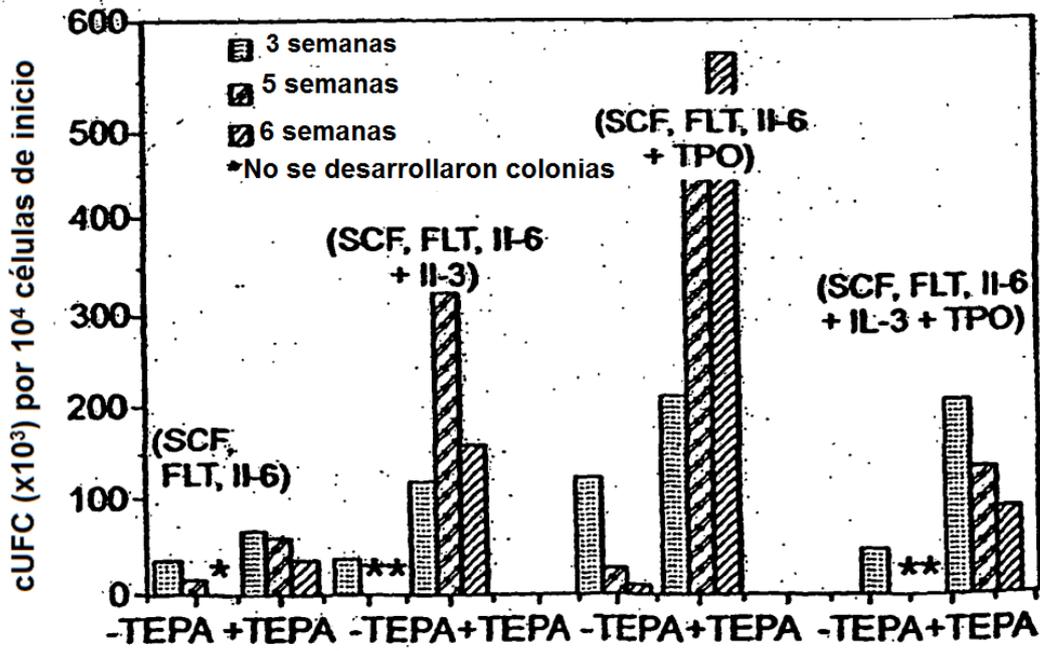


Fig. 13

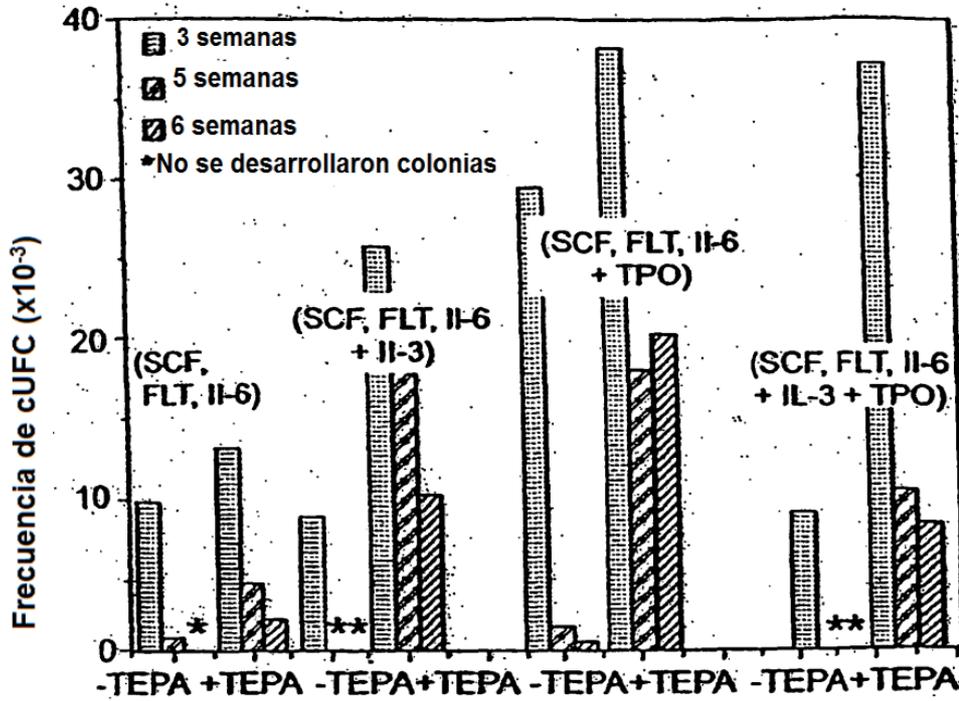


Fig. 14

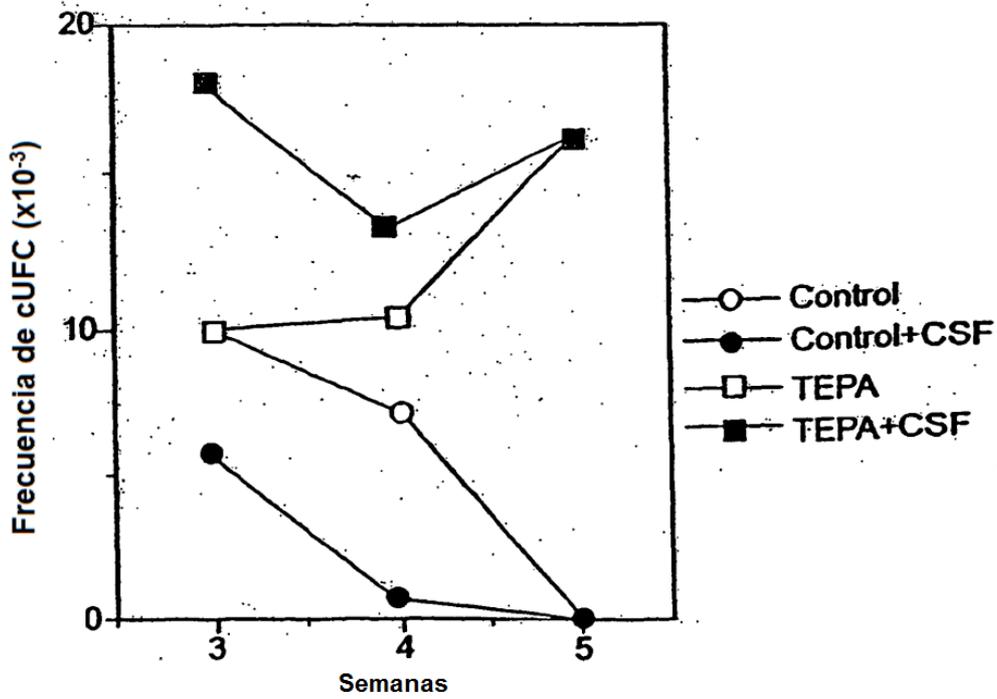


Fig. 15

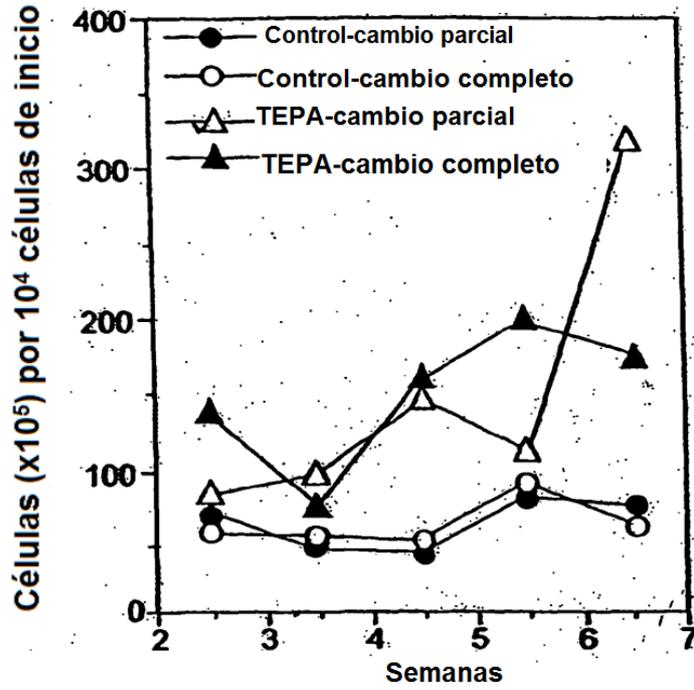


Fig. 16

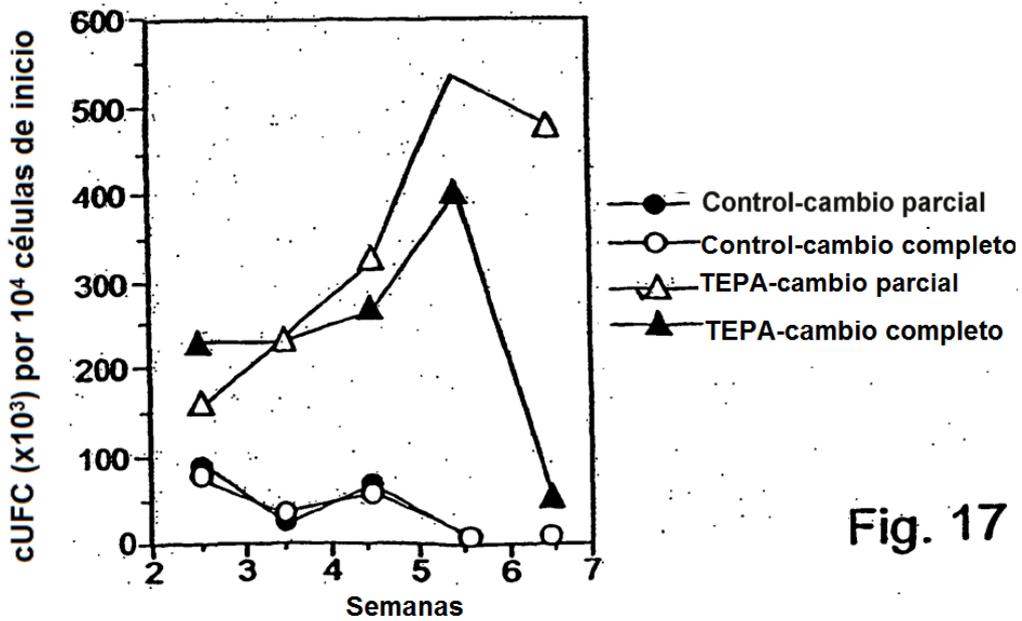


Fig. 17

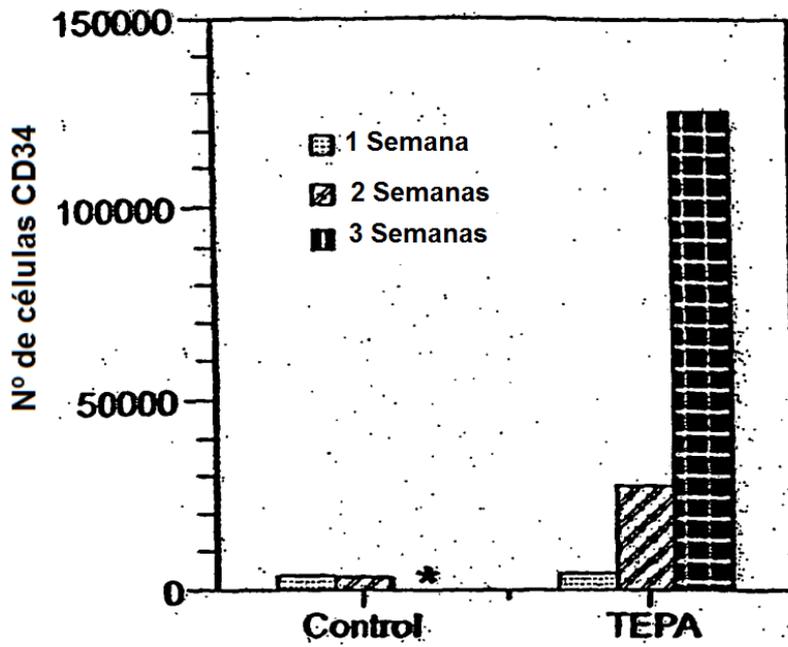


Fig. 18

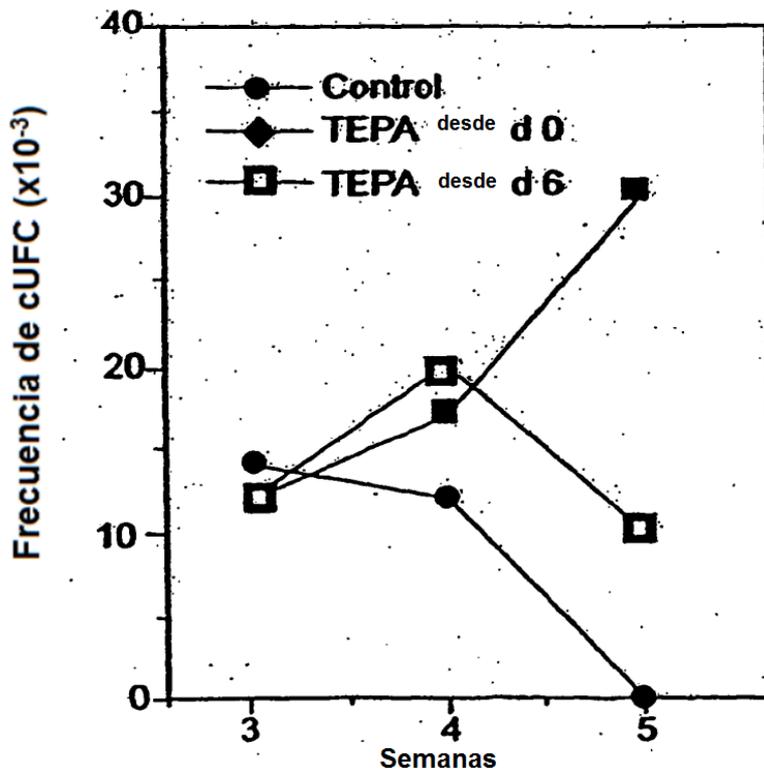
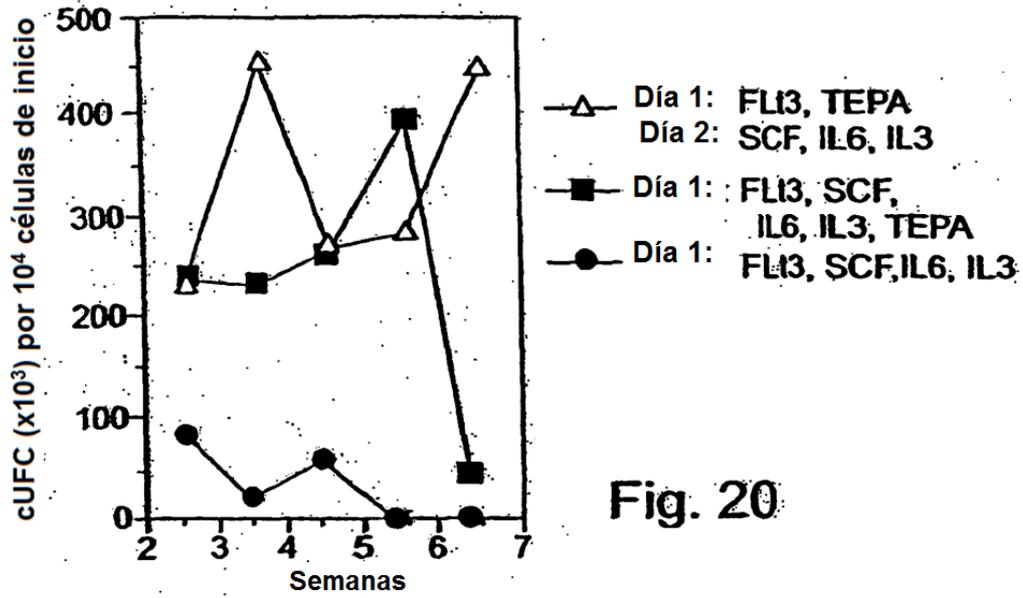
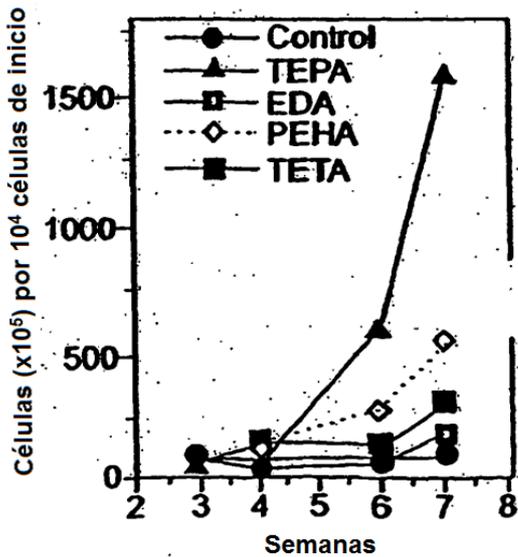


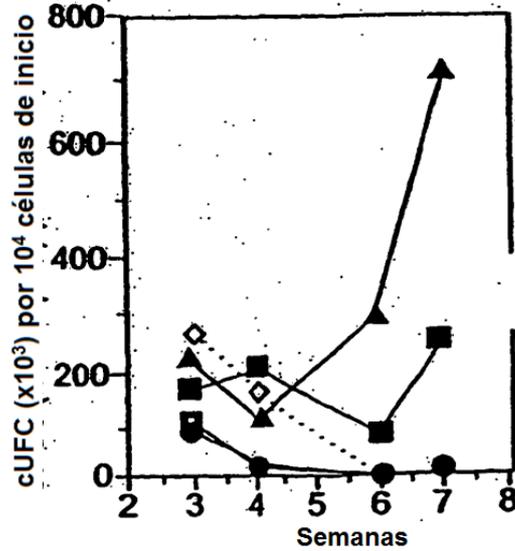
Fig. 19



**Fig. 20**



**Fig. 21a**



**Fig. 21b**

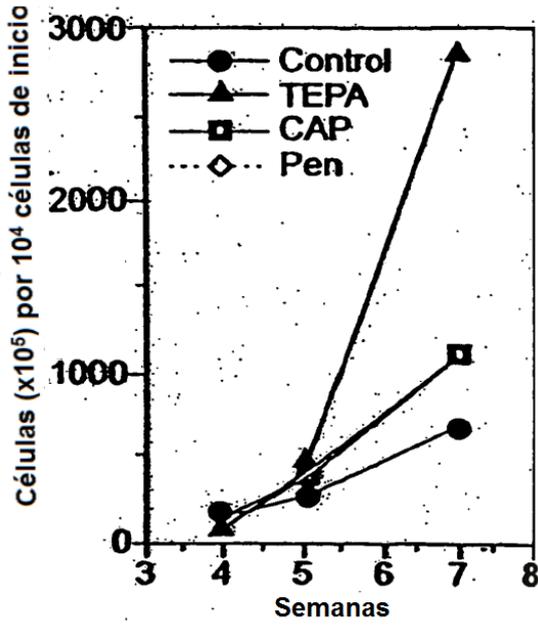


Fig. 22a

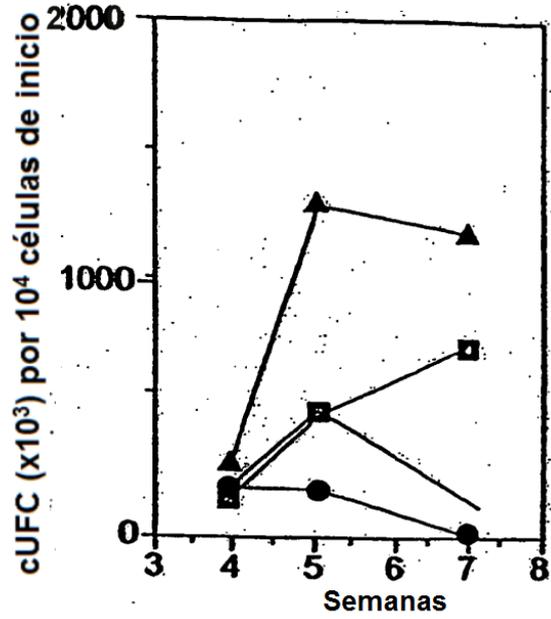


Fig. 22b

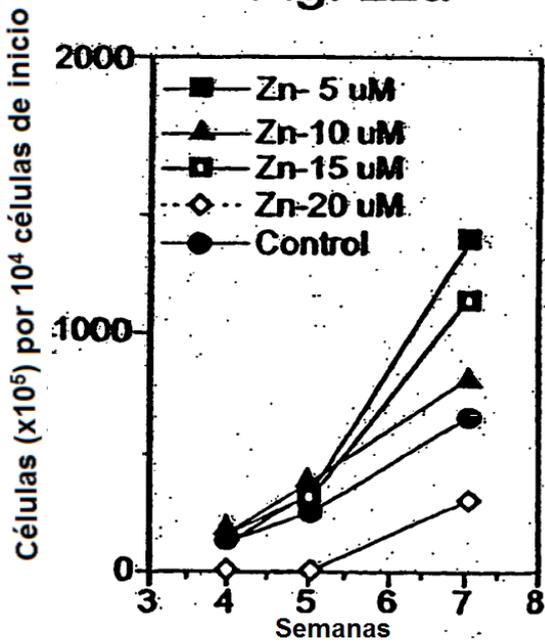


Fig. 23a

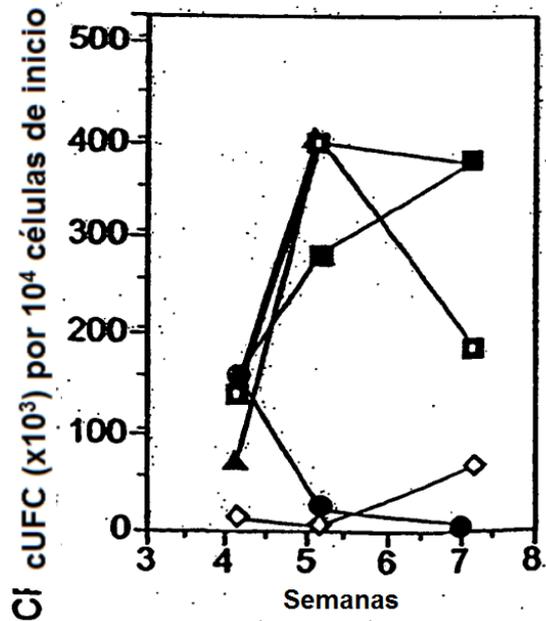


Fig. 23b

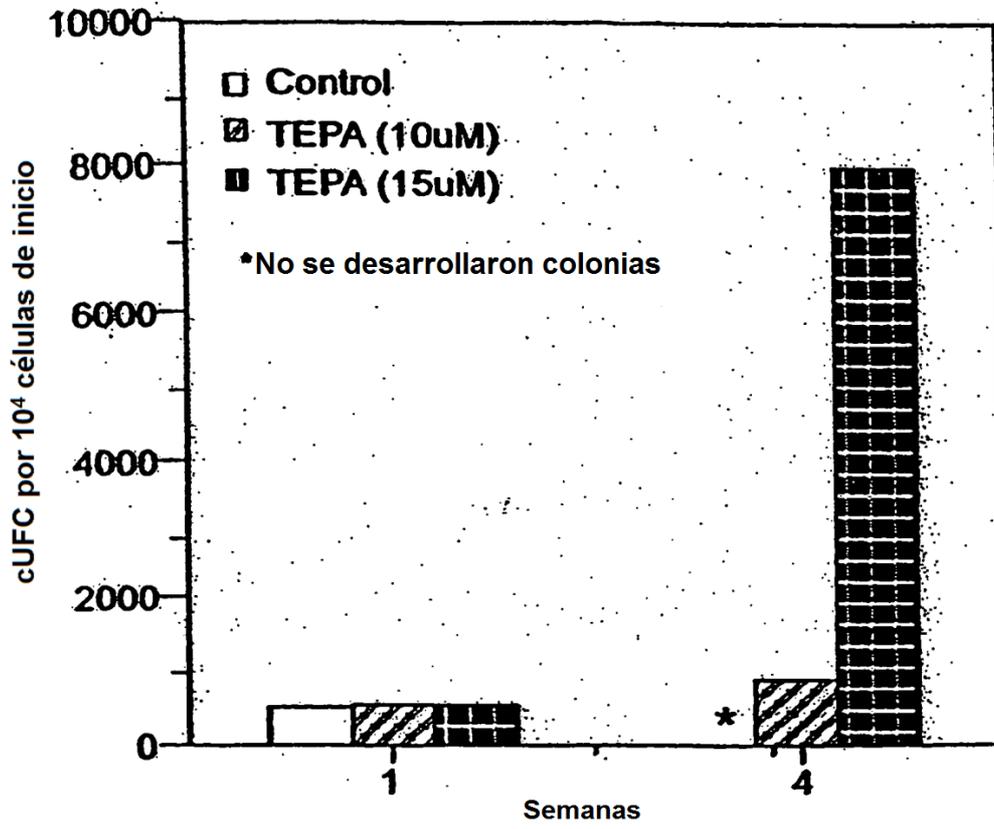


Fig. 24