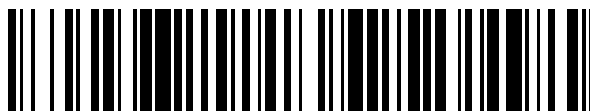


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 734**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2004** **E 04716880 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013** **EP 1668109**

54 Título: **Células madre hematopoyéticas tratadas mediante fucosilación in vitro y métodos de uso**

30 Prioridad:

18.04.2003 US 463788 P
30.01.2004 US 769686

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
26.07.2013

73 Titular/es:

OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
825 N.E. 13th Street
Oklahoma City, OK 73104, US

72 Inventor/es:

XIA, LIJUN y
MCEVER, RODGER P.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 415 734 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

Células madre hematopoyéticas tratadas mediante fucosilación *in vitro* y métodos de uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere generalmente a métodos para tratar células madre hematopoyéticas (CMHs) para mejorar su utilidad terapéutica y más particularmente tratar células madre hematopoyéticas derivadas de sangre del cordón, y células madre hematopoyéticas así tratadas.

Durante la inflamación, la selectina P y la selectina E median cooperativamente la circulación y adhesión de leucocitos sobre superficies vasculares (McEver, R.P. Selectinas: lectinas que inician la adhesión celular bajo flujo. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Oct; 14:581-856). En el proceso de trasplante de médula ósea, la selectina P y la selectina E también median la conducción de CMHs inyectadas intravenosamente a la médula ósea. (Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., Von Andrian, U.H., Wagner, D.D. Selectinas endoteliales y molécula-1 de adhesión celular vascular promueven la conducción del progenitor hematopoyético a la médula ósea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:14423-14428). En la mayoría de los tejidos, la selectina P y la selectina E se expresan en células endoteliales después de la estimulación de agonistas, pero se expresan constitutivamente en células endoteliales de la médula ósea. Las selectinas usan glicanos $\alpha 2,3$ -sialilados y $\alpha 1,3$ -fucosilados tales como sialil Lewis^x (sLe^x) en glicoproteínas o glicolípidos como ligandos. La selectina P se enlaza a la región de terminal N del ligando-1 de glicoproteína de selectina P (PSGL-1), que contiene sulfatos de tirosina y un glicano O tapado con sLe^x. La selectina E se enlaza con uno o más sitios diferentes en PSGL-1. Para interactuar con la selectina E, PSGL-1 no necesita la sulfación de tirosina, pero la expresión de sLe^x sobre glicanos O mejora el enlace. La selectina E también interactúa con otros ligandos sobre CMHs. Una isoforma de CD44 sobre CMHs ha demostrado que se enlaza con la selectina E *in vitro* (Dimitroff, C. J. Lee, J. Y.; Rafii, S., Fuhlbrigge, R. C., Sackstein, R. CD44 es un ligando principal de selectina E en células madre hematopoyéticas de progenitor. *J. Cell Biol.* Jun 11 2001; 153:1277-1286). Otro ligando potencial para la selectina E sobre CMHs es el ligando-1 de selectina E (ESL-1) (Wild, M. K., Huang, M. C., Schulze-Horsel, U. van Der Merwe, P.A., Vestweber, D. Afinidad, cinética y termodinámica de enlace de selectina E que se enlaza con ligando-1 de selectina E. *J Biol Chem.* 2001 Ago 24; 276:31602-31612). Se piensa que cada uno de estos ligandos transporta estructuras sLe^x.

Las células madre hematopoyéticas cosechadas de un individuo pueden trasplantarse a la médula ósea de otro individuo siguiendo una infusión intravenosa. La técnica se ha usado en gran medida en el tratamiento de varios trastornos hematológicos tales como leucemia (Thomas, E. D, Historia, resultados actuales e investigación en trasplantes de médula ósea. *Perspectives Biol. Med.* 38:230-237, 1995). Clínicamente, las CMHs humanas se obtienen de tres fuentes diferentes: médula ósea, sangre periférica adulta después de la movilización, y sangre del cordón obtenida de cordones umbilicales después del parto. Aunque hay más de 5 millones de donantes voluntarios de médula ósea no relacionados registrados en todo el mundo, encontrar un donante no relacionado que coincida completamente con el antígeno leucocitario humano (ALH) sigue siendo un problema para muchos pacientes debido al polimorfismo de ALH. En comparación con la médula ósea y la sangre periférica humana, la sangre del cordón tiene varias ventajas potenciales, en particular la amplia y rápida disponibilidad de células y menos requisitos rigurosos para la identidad de ALH entre donante y receptor debido al bajo riesgo de enfermedad de injerto contra huésped (EICH) severa y crónica (Rocha, V., et al., Comparación de resultados de trasplantes no relacionados de médula ósea y sangre del cordón umbilical en niños con leucemia aguda. *Blood.* 97:2962-71. 2002). Las ventajas potenciales del trasplante usando CMHs de la sangre del cordón en lugar de CMHs de la médula ósea o sangre periférica adulta incluyen: (1) un gran grupo de donantes potenciales; (2) rápida disponibilidad, ya que la sangre del cordón se ha pre-cribado y testado; (3) puede conseguirse mayor diversidad racial en los bancos al concentrar los esfuerzos de recogida en hospitales donde nacen niños bajo orígenes étnicos representados; (4) riesgo reducido de incomodidad para el donante; (5) rara contaminación por virus; y (6) menor riesgo de enfermedad de injerto contra huésped (donde las células del donante atacan los órganos y tejidos del paciente), incluso para receptores con una coincidencia de tejido menos que perfecta. De este modo, las CMHs derivadas de la sangre del cordón se han usado cada vez más para trasplante de médula ósea en años recientes.

En el escenario del trasplante, las CMHs infundidas intravenosamente se extravasan específicamente en la médula ósea para implantar y proliferar, un proceso que se define como conducción CMH. La conducción se ha estudiado extensamente tanto *in vivo* como *in vitro* y se cree que se basa en las interacciones de la molécula de adhesión entre CMHs y el endotelio de la médula ósea. Las selectinas con un grupo de moléculas de adhesión que contienen un dominio de reconocimiento de carbohidrato en terminal N relacionado con aquellos en las lectinas animales Ca⁺⁺-dependientes (tipo C). La selectina P, expresada en plaquetas activadas y células endoteliales, y la selectina E, expresada en células endoteliales activadas, se enlazan con ligandos glicoconjugados en leucocitos y CMHs. El ligando de glicoproteína mejor caracterizado es PSGL-1, una mucina con muchos oligosacáridos enlazados con O sialilados y fucosilados. PSGL-1 se expresa en leucocitos y CMHs. Los estudios con ratones deficientes de PSGL-1 han demostrado que PSGL-1 media la atadura de leucocitos y la conducción sobre selectina P y apoya la unión de selectina E en flujo. PSGL-1 también se enlaza con la selectina L, que inicia las interacciones leucocito-leucocito que amplifican la conducción de leucocitos sobre superficies de células endoteliales inflamadas. En PSGL-1 humano, el sitio de enlace de la selectina P y la selectina L comprende una secuencia peptídica que

contienen tres residuos de sulfato de tirosina cercanos a una trionina a la que se une un específico glicano-O núcleo-2 fucosilado ramificado (McEver, R. P., Cummings, R. D. Papel de enlace de PSGL-1 con selectinas en reclutamiento de leucocitos. J Clin Inves. 100:S97-103. 1997; R. P. McEver: Selectinas: Ligandos que inician la adhesión celular bajo flujo. Curr. Op. In Cell Biol. 14: 581-586, 2002). La fracción de fucosa es esencial para el enlace de selectina P como se mide por ensayos *in vitro* que usan glicosulfopéptidos sintéticos. La fucosilación se cataliza por una familia de α 1,3-fucosiltransferasas. Entre ellas, α 1,3-fucosiltransferasa IV (FT-IV) y α 1,3-fucosiltransferasa VII (FT-VII) se expresan principalmente en leucocitos humanos. Estas enzimas catalizan la transferencia de un residuo de fucosa de un donante, por ejemplo, GDP-fucosa, a un receptor en unión α 1,3 a GlcNAc en secuencias Gal-GlcNAc. Tanto FT-IV como FT-VII hacen la adición de fucosa que es necesaria para formar la estructura de sLe^x (NeuAc α 2,3Gal β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAc β 1-R). El sLe^x sobre un O-glicano núcleo-2 unido a una treonina específica en la secuencia de aminoácido de terminal N de PSGL-1 humano es fundamental para el enlace con selectina P.

Las CMHs tienen el potencial para diferenciarse en diferentes linajes de células hematopoyéticas tales como glóbulos rojos, células mieloides, linfocitos y plaquetas. Las CMHs humanas expresan una glicoproteína de superficie, CD34, que rutinariamente se usa para la identificación y separación de CMH. Tales células humanas CD34⁺ (células que expresan antígeno CD34) representan una población heterogénea de progenitores con varios grados de maduración hematopoyética. La ausencia de ("–") o la expresión reducida ("baja") de otra proteína de superficie, CD38, en células humanas CD34⁺ se considera que es un marcador sustituto de una sub-población primitiva de células CD34⁺. De este modo, las células de la sub-población CD34⁺CD38^{baja/-}, que comprende aproximadamente el 10-20% del total de células CD34⁺ de la médula ósea o sangre periférica adulta, están altamente enriquecidas para el multiprogenitor y la actividad de la célula madre, incluyendo la habilidad de injerto. Notablemente, aproximadamente el 30% de las CMHs de la sangre del cordón son CD34⁺CD38^{baja/-}. Sin embargo, a diferencia de las células madre de la sangre periférica humana CD34⁺CD38^{baja/-}, las CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} de la sangre del cordón se conocen por tener una conducción reducida a la médula ósea murina, que es principalmente dependiente de las interacciones de CMHs humanas con selectina P murina sobre el endotelio vascular (Hidalgo, A., Weiss, L. A. y Frenette, P. S. Ligandos funcionales de selectina que median la interacción de célula humana CD34⁺ con endotelio de médula ósea se mejoran post-natalmente. Los recorridos de adhesión que median la conducción de la célula progenitora hematopoyética a la médula ósea. J. Clin. Invest. 110:559-569. 2002). Los análisis de citometría de flujo indican que este defecto de conducción resulta del PSGL-1 no funcional, expresado en estas CMHs derivadas de la sangre del cordón de CD34⁺CD38^{baja/-}. De este modo, la habilidad disminuida de CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} para enlazarse con selectina P explica al menos en parte el injerto retrasado de plaqueta y mieloides asociado con el trasplante de CMH de sangre del cordón. El uso de CMHs de sangre del cordón para trasplante se ha restringido principalmente a niños (que requieren menos células para trasplante) debido a las cantidades limitadas y la habilidad defectuosa de conducción de CMHs aisladas de los cordones umbilicales.

Una invención que corrija el defecto de conducción de CMHs aumentaría de manera significativa el potencial de la sangre del cordón umbilical como una fuente de células madre hematopoyéticas y de este modo llevaría a disminuir los riesgos de enfermedad de injerto contra huésped severa y crónica y mejoraría el éxito de reconstitución de médula ósea.

Resumen de la invención

La presente invención es una realización que contempla un método de mejora del enlace con la selectina P o selectina E de las CMHs de la sangre del cordón umbilical que comprende el tratamiento de una cantidad o población de CMHs, al menos algunas de las cuales carecen de o tienen una expresión reducida de proteína de superficie CD38, *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa, donde las CMHs tratadas han aumentando el enlace con selectina P y selectina E. Además, las CMHs típicamente se caracterizan por comprender ligando-1 de glicoproteína de selectina P (PSGL-1) y/u otros ligandos de selectina que no se enlazan de manera efectiva con selectina P o selectina E. Más particularmente, el PSGL-1 u otros ligandos de selectina que se dan en las CMHs de CD34⁺CD38^{baja/-} carecen de, o tienen menos, glicanos fucosilados, particularmente O-glicanos, y pueden por ejemplo, tener PSGL-1 que tienen O-glicanos núcleo-2 que comprenden NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc y que carecen de fucosa en la unión α 1,3 con el GlcNAc. Las CMHs, en su estado no tratado antes de la fucosilación como se describe en el presente documento, tienen una reducida habilidad para la conducción de la médula ósea y se caracterizan por tener una mejor habilidad de conducción a la médula ósea después del tratamiento de fucosilación. En el método contemplado en el presente documento, la α 1,3-fucosiltransferasa puede ser, por ejemplo, una α 1,3-fucosiltransferasa IV, una α 1,3-fucosiltransferasa VI o una α 1,3-fucosiltransferasa VII, o una combinación de las mismas. El donante de fucosa puede ser, por ejemplo, GDP-fucosa.

La invención contempla además en una realización una composición de CMHs humanas tratadas que comprenden CMHs CD34⁺ derivadas de sangre del cordón que carecen de o tiene una reducida expresión de proteína CD38 de superficie (CD38^{baja/-}), donde las CMHs son capaces de enlazarse con selectina P y selectina E. Las CMHs pueden estar dispuestas en un transportador farmacéuticamente aceptable, o diluyente, o vehículo para su almacenamiento o administración a un paciente. La invención se dirige además a un método de tratamiento, que comprende la administración de una cantidad efectiva de CMHs a un sujeto que tiene un desorden hematológico u otra enfermedad que requiere o se beneficia de un trasplante de CMHs para su tratamiento.

Como se ha señalado anteriormente, después del tratamiento de fucosilación descrito en el presente documento, las CMHs CD34⁺ tratadas (incluyendo CMHs CD34⁺CD38^{baja/-}) han mejorado el enlace con selectina P y selectina E, en comparación con CMHs CD34⁺ no tratadas. El enlace mejorado con selectina P (o selectina E) se define como al menos el 10% de las CMHs tratadas que tienen fluorescencia en un ensayo de enlace de selectina P (o selectina E, respectivamente) que es mayor que un umbral de fluorescencia predeterminado (como se define más abajo). En otra realización, al menos el 25% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 50% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 75% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 90% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 95% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado.

La presente invención contempla además un producto de sangre producido por el método que incluye las etapas de tratar una cantidad o población de CMHs, siendo al menos una parte de ellas CD34⁺ y que carecen de o tienen una expresión reducida de proteína CD38 *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa, donde la mayoría de las CMHs tratadas han mejorado el enlace con selectina P (o selectina E) como se describe en el presente documento. La cantidad de CMHs se derivan de la sangre del cordón umbilical. La cantidad o población de CMHs podría comprender una parte, una muestra no fraccionada, de sangre.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. A. Tinción de anticuerpo CD34 de células mononucleares (CMNs) aisladas de la sangre del cordón humano. B. Tinción de anticuerpo CD34 de células después del enriquecimiento de CD-34. C. Tinción de IgG de control de isótopos de células CD34⁺. Los ejes son de intensidad fluorescente como se miden por la citometría de flujo.

Figura 2. A. Células CD34⁺ aisladas de sangre del cordón expresan PSGL-1. Las células CD34⁺ consisten en aproximadamente 30% de células CD34⁺CD38^{baja/-} (progenitores primitivos) y aproximadamente 60% de células CD34⁺CD38⁺. Los ejes son de intensidad fluorescente como se mide por la citometría de flujo.

Figura 3. A. Células CD34⁺ se controlan mediante una compuerta como células de enlace de selectina P (R2) o células de enlace de selectina no P (R1). B. 24% $\pm$ 5% de células CD34⁺ de la región R1 no tienen o tienen una expresión reducida de CD38. El resultado es representativo de cuatro análisis independientes de citometría de flujo y muestra que los números significativos de CMHs que se enlazan con selectina no P son CD34⁺ y CD38^{baja/-}.

Figura 4. La viabilidad de células después de fucosilación *in vitro* como se mide por tinción con ioduro de propidio (IP). A. Células sin tratamiento. B. Células tratadas como control. C. Células tratadas con FT-VI. Los ejes son de intensidad fluorescente como se mide por la citometría de flujo.

Figura 5. 15% de las células CD34⁺ obtenidas de la sangre del cordón expresan bajos o ningún epítipo fucosilado cuando se tiñe con anticuerpo HECA 452 monoclonal específico de sLe^x. B. α 1,3-fucosilación *in vitro* con FT-VI y GDP-fucosa aumenta radicalmente los epítopos sLe^x en las células CD34⁺ obtenidas derivadas de la sangre del cordón. Los ejes son de intensidad fluorescente como se mide por la citometría de flujo.

Figura 6. Titulación de enlace de selectina P con CMHs de CD34⁺ por citometría de flujo para determinar una cantidad de saturación de selectina P.

Figura 7. Enlace de concentración saturable de selectina P soluble para células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón. A. Aproximadamente el 27% de células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón no tratadas no se enlazan o tienen un nivel bajo de enlace con selectina P. B. α 1,3-fucosilación *in vitro* convierte las células CD34⁺ que son negativas o bajas para el enlace con selectina P en células que son positivas o altas para el enlace con selectina P. C. y D. La selectina P se enlaza con PSGL-1 en células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón como se verifica por el bloque de anticuerpos monoclonales para selectina P (G1) y PSGL-1 (PL1). EDTA también inhibe el enlace, consistente con el requisito para Ca²⁺ para apoyar el enlace de selectina P con PSGL-1. Los ejes son de intensidad fluorescente como se mide por la citometría de flujo.

Figura 8. Circulación de células CD34⁺ en albúmina de suero humano (ASH) o en selectina P humana bajo fuerza de cizallamiento. El tratamiento de células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón con GDP-fucosa y FT-VI aumenta de manera significativa la circulación en selectina P en flujo de cizallamiento.

Figura 9. Enlace de concentración saturable de selectina E soluble para células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón. A. Aproximadamente el 24% de células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón no tratadas no se enlazan o tienen un nivel bajo de enlace con selectina E. B. α 1,3-fucosilación *in vitro* convierte las células CD34⁺ que son negativas o bajas para el enlace con selectina E en células que son positivas o altas para el enlace con selectina E. C. y D. La selectina E se enlaza con células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón como se verifica por el bloque de anticuerpos monoclonales para selectina E (9A9). EDTA también inhibe el enlace. Los ejes son de intensidad

fluorescente como se mide por la citometría de flujo. El resultado es representativo de tres mediciones independientes.

Figura 10. La fucosilación *in vitro* aumenta de manera significativa las células CD34⁺ que circulan en la selectina E soluble humana bajo fuerzas de cizallamiento. A y B. El tratamiento de células SC CD34⁺ con GDP-fucosa y FT-VI aumenta de manera significativa el número de células que circulan en selectina E bajo diferentes fuerzas de cizallamiento. La circulación es dependiente de la selectina E cuando las células no circulan en albúmina de suero humano (ASH) y la circulación se bloqueó específicamente por ES1, un mAb para selectina E humana, pero no por PL1, un mAb que se enlaza con el sitio de enlace de la selectina P de PSGL-1. C y D. Las células CD34⁺ fucosiladas son más resistentes a las fuerzas de cizallamiento que las células CD34⁺ no tratadas. Los datos representan la media $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes.

Figura 11. Las CMHs SC fucosiladas muestran un injerto mejorado en médula ósea de ratones NOD/SCID subletalmente irradiados. La médula ósea (MO) o la sangre periférica (SP) de los ratones 6 semanas después del trasplante con 8×10^6 células SC tratadas como control o tratadas con FTVI se analizaron para injerto de células hematopoyéticas derivadas de humanos. (A) Análisis de citometría de flujo de células de MO y SP teñidas con un mAb con el marcador humano pan-leucocito CD45 demostró una duplicación de células derivadas de humanos en ratones trasplantados con células SC fucosiladas. (B) En comparación con ratones trasplantados con células SC sin fucosilación, las células de la MO de ratones trasplantados con células SC fucosiladas contienen de manera significativa más progenitores humanos que forman colonias, que incluyen BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM, como los demuestran los ensayos de progenitores hematopoyéticos humanos. La médula ósea de los ratones de control inyectada con salino solamente no produjo colonias, lo que confirma la especificidad del ensayo.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención en una realización contempla un método de mejora del enlace con la selectina P o selectina E de las CMHs de la sangre del cordón umbilical que comprende el tratamiento de una cantidad o población de CMHs que carecen de o tienen una expresión reducida (menos del nivel normal de expresión de CD38) de proteína de superficie CD38, *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa, donde las CMHs tratadas así han aumentando el enlace con selectina P y selectina E sobre las CMHs no tratadas. Además, las CMHs no tratadas típicamente se caracterizan por comprender predominantemente PSGL-1 u otros ligandos de selectina que no se enlazan adecuadamente con la selectina P o selectina E. El PSGL-1 u otros ligandos de selectina que se dan en las CMHs de CD38^{baja/-} carecen de o tienen números reducidos de glicanos fucosilados, tales como O-glicanos, y pueden por ejemplo, tener PSGL-1 que tienen O-glicanos núcleo-2 que comprenden NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNac pero que carecen de una fucosa en la unión α 1,3 con el GlcNac. Las CMHs de CD38^{baja/-}, en su estado no tratado antes de la fucosilación, tienen una reducida habilidad para la conducción a la médula ósea. Las CMHs se derivan de la sangre del cordón umbilical humano (SC) y se caracterizan por necesitar, o beneficiarse de, más fucosilación para mejorar su habilidad de conducción a la médula ósea. En el método contemplado en el presente documento, la α 1,3-fucosiltransferasa puede ser, por ejemplo, una α 1,3-fucosiltransferasa IV, una α 1,3-fucosiltransferasa VI, o una α 1,3-fucosiltransferasa VII. El donante de fucosa puede ser, por ejemplo, GDP-fucosa.

La invención contempla en una realización una composición de CMHs humanas tratadas que comprenden CMHs derivadas de sangre del cordón que carecen de o tiene una expresión reducida de proteína de superficie CD38 (CD38^{baja/-}), donde las CMHs tratadas comprenden PSGL-1 u otros ligandos de selectina que están adecuadamente fucosilados (por ejemplo, comprenden sialil Lewis^x) y que son capaces de enlazarse con selectina P (o selectina E). Las CMHs tratadas pueden estar dispuestas en un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable para su almacenamiento o administración a un paciente. La invención se dirige además a un método de tratamiento, que comprende la administración de una cantidad efectiva de las CMHs tratadas a un sujeto que tiene un desorden hematológico u otra enfermedad que requiera trasplante de CMHs para su tratamiento.

En una realización, la composición de las CMHs tratadas comprende una población de CMHs humanas derivadas de sangre del cordón umbilical, caracterizándose al menos una parte de ellas como CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} que tienen un enlace mejorado con selectina P (o selectina E). El enlace mejorado con selectina P (o selectina E) se define como al menos el 10% de las CMHs tratadas que tienen fluorescencia en un ensayo de enlace de selectina P (o ensayo de enlace con selectina E, respectivamente) que es mayor que un umbral de fluorescencia. En otra realización, al menos el 25% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 50% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 75% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 90% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. En otra realización, al menos el 95% de las CMHs tratadas excede el umbral de fluorescencia predeterminado. La composición de las CMHs humanas está preferentemente dispuesta en un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable para su almacenamiento y administración a un sujeto.

El umbral de fluorescencia predeterminado en una realización se determina primero obteniendo una muestra de células que contengan al menos 100 CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} de una fracción mononuclear de sangre de cordón umbilical normal (sangre del cordón de bebés sanos a término). Esta muestra de control (punto de referencia) de

CMHs se somete a ensayo usando el ensayo de enlace de selectina P (o ensayo de enlace de selectina E) descrito en otra parte en el presente documento, o por otro ensayo de enlace de fluorescencia de selectina P (o ensayo de enlace de selectina E, respectivamente) conocidos en la técnica. Los niveles de fluorescencia de enlace de selectina P (o selectina E) se miden para las CMHs de CD34⁺CD38^{baja/-} en la muestra de control (punto de referencia). En una
 5 realización, se selecciona un valor de fluorescencia que excede los niveles de fluorescencia de enlace de selectina P (o selectina E) de al menos el 95% de las CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} en la muestra de control. El valor de fluorescencia seleccionado se designa como el umbral de fluorescencia predeterminado contra el que se compara la fluorescencia de enlace de la selectina P (o selectina E) de las CMHs tratadas (es decir, fucosiladas).

10 La presente invención contempla además un producto de sangre producido por el método de proporcionar una cantidad o población de CMHs, siendo una parte al menos CD34⁺ y que carecen de o tienen una expresión reducida de la proteína CD38, y tratar la cantidad de CMHs *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa, donde la mayoría de las CMHs tratadas se enlazan con selectina P (o selectina E). La cantidad de CMHs se deriva de sangre del cordón umbilical.

15 En general, la presente invención contempla un método donde PSGL-1 no funcional o sub-óptimamente funcional u otros ligandos de selectina se expresaron en CMHs de sangre del cordón modificadas por tecnología de α 1,3-fucosilación *in vitro* para corregir el defecto de conducción, lo que mejora su uso en el trasplante de médula ósea.

20 Como se ha señalado anteriormente, las CMHs de sangre del cordón CD34⁺ pueden definirse como CD38⁺ (positivas para CD38) o CD38^{baja/-} (reducidas o sin expresión de CD38). Las CMHs de sangre del cordón CD38^{baja/-} pueden identificarse usando técnicas como las descritas más abajo. Las CMHs de sangre del cordón se tratan con un anticuerpo de enlace de CD34 que tiene un fluoróforo unido al mismo, y con un anticuerpo que se enlaza a CD38 que tiene un fluoróforo diferente unido al mismo. Las células CD34⁺ se definen como aquellas CMHs que muestran
 25 fluorescencia del fluoróforo de anticuerpo anti-CD34 tras irradiación. Las CMHs CD38^{baja/-} se definen como el 30% de las CMHs CD34⁺ que tienen la fluorescencia más baja como la medida del anticuerpo de enlace anti-CD38, o como las CMHs CD34⁺ que tiene niveles de fluorescencia de anticuerpo de enlace anti-CD38 de 50 unidades o menos (como lo mide la citometría de flujo fluorescente como se describe en otra parte en el presente documento). En una realización, el fluoróforo de anticuerpo de enlace anti-CD34 es FITC (isotiocianato de fluoresceína), mientras
 30 que el fluoróforo de anticuerpo de enlace anti-CD38 es ficoeritrina (FE).

Como se ha explicado previamente, las células CD34⁺ expresan PSGL-1 u otros ligandos de selectina, aún una cantidad significativa de células CD34⁺ primitivas que son bajas en o carecen de CD38 (por ejemplo, que comprenden aproximadamente el 30% del total de células de sangre del cordón CD34⁺), no se enlazan con selectina
 35 P (o selectina E) o se enlazan solamente cantidades bajas de selectina P (o selectina E, respectivamente). PSGL-1 es una mucina homodimérica expresada en casi todos los leucocitos que incluyen células CD34⁺. Para ser funcional, es decir, capaz de enlazarse con selectina P o selectina E, PSGL-1 requiere varias modificaciones post-traslacionales que llevan a la formación de un grupo sLe^x en el mismo, incluyendo α 1,3-fucosilación. Una α 1,3-fucosilación insuficiente, por ejemplo, da como resultado una habilidad disminuida de células T no tratadas para interactuar con selectinas vasculares. En la presente invención se ha descubierto que la inhabilidad de las CMHs de la sangre del cordón para enlazarse con selectina P o selectina E se debe a la inadecuada α 1,3-fucosilación de
 40 PSGL-1 u otros ligandos de selectina. Por lo tanto, la base de la presente invención es que el tratamiento de células CD34⁺ *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa (por ejemplo, FT-VI) que también cataliza la síntesis de la estructura sLe^x, aumentará la fucosilación de PSGL-1 u otros ligandos de selectina y de este modo corregirá el defecto de conducción de las CMHs.

Las fucosiltransferasas que son capaces de transferir fucosa en la unión 1,3 con GlcNAc son bien conocidas en la técnica. Varias están comercialmente disponibles, por ejemplo, de Calbiochem. Además, al menos cinco tipos diferentes de α 1,3-fucosiltransferasas (FTIII-VII) están codificadas por el genoma humano. Estas incluyen: la enzima
 50 Lewis (FTIII), que puede transferir fucosa bien α (1,3) o α (1,4) a Gal β 4GlcNAc o Gal β 3GlcNAc respectivamente (Kukowska-Latallo et al., Genes Dev. 4:1288, 1990); FTIV que forma uniones α (1,3), que no prefiere precursores sialilados (Goelz, et al., Cell 63; 1349, 1989; Lowe, et al., J. Biol. Chem. 266; 17467, 1991); FTV (Weston, et al., J. Biol. Chem. 267:4152, 1992a) y FTVI (Weston, et al., J. Biol. Chem. 267:24575, 1992b) que forma uniones α (1,3), que pueden fucosilar bien precursores sialilados o no sialilados, y FTVII, (Sasaki, et al., J. Biol. Chem. 269:14730, 1994); Natsuka, et al., J. Biol. Chem. 269:16789, 1994) que puede fucosilar solamente precursores sialilados.

FTIII se codifica por GDB:135717; FTIV por GDB:131563; FTV por GDB:131644; FTVI por GDB:135180; y FTVII por GDB:373982. Una sexta α 1,3-fucosiltransferasa (FTIV) se codifica por GDB:9958145 (Números ID de Acceso a Base de Datos del Genoma están disponibles en GDB^(TM) Base de Datos del Genoma Humano de Toronto (Ontario, Canadá): El Hospital para Niños Enfermos, Baltimore, (Maryland, Estados Unidos): Universidad Johns Hopkins, 1990-. Disponible en internet: URL <http://www.gdb.org/>). La presente invención contempla además usar otras α 1,3-fucosiltransferasas no humanas disponibles y conocidas para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo las mostradas en las Patentes de Estados Unidos N° 6.399.337 y N° 6.461.835.

65 Como se ha señalado anteriormente, las CMHs humanas pueden obtenerse para el tratamiento con α 1,3-fucosiltransferasas, por ejemplo, mediante separación de otras células en una fuente de sangre del cordón umbilical,

sangre periférica, o médula ósea. Pueden emplearse varias técnicas para obtener por separado las células madre CD34⁺CD38^{baja/-} solas, o en combinación con CMHs CD34⁺CD38⁺. Los anticuerpos monoclonales son particularmente útiles para identificar marcadores (proteínas de la membrana de la superficie) asociados con linajes celulares particulares y/o fases de diferenciación. Los anticuerpos pueden estar unidos a un soporte sólido para permitir la separación cruda. Las técnicas de separación empleadas deberían maximizar la retención de viabilidad de la fracción que se recogerá. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de la separación, citotoxicidad de la metodología, facilidad y rapidez de actuación, y necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidad técnica.

Los procedimientos para la separación pueden incluir separación magnética, que usa gotas magnéticas cubiertas de anticuerpo, y "criba" con anticuerpo unido a una matriz sólida, por ejemplo, placa u otra técnica conveniente. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen clasificadores celulares activados por fluorescencia, que pueden tener varios grados de sofisticación, por ejemplo, una pluralidad de canales de color, canales detectores de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso, y canales de obstrucción.

Convenientemente, los anticuerpos pueden conjugarse con marcadores, tales como gotas magnéticas, que permite la separación directa; biotina, que puede extraerse con avidina o estreptavidina unida a un soporte; fluorocromos, que pueden usarse con un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), o similares, para permitir la separación sencilla del tipo de célula particular. Puede emplearse cualquier técnica que no sea excesivamente perjudicial para la viabilidad de las células restantes.

En una realización, las CMHs que carecen de marcadores celulares maduros, pueden enriquecerse sustancialmente, donde las células pueden después separarse por FACS u otra metodología que tenga elevada especificidad. Los análisis multicolores pueden emplearse con el FACS que es particularmente conveniente. Las células pueden separarse en base al nivel de tinción para los antígenos particulares. Los fluorocromos, que pueden encontrar uso en un análisis multicolor, incluyen ficobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrina y alofocianinas, fluoresceína, y rojo Texas, por ejemplo. Alternativamente, las CMHs pueden tratarse con fucosiltransferasas antes de la separación de las CMHs deseadas de la muestra de sangre no fraccionada, usando células mononucleares totales de sangre del cordón.

En una realización, las CMH CD34⁺, que incluyen células CD34⁺CD38^{baja/-} pueden tratarse añadiendo fucosiltransferasa libre a la composición celular, donde el producto de sangre final que contiene CD34⁺CD38^{baja/-} fucosilado también contiene la fucosiltransferasa que se usó para tratar las células. En otra realización, las CMHs pueden tratarse usando fucosiltransferasas que se unen a un soporte, tal como gotas magnéticas, o cualquier otro soporte conocido por aquellos expertos en la técnica, que pueden separarse de la composición celular después de que el proceso del tratamiento se haya completado.

MÉTODOS Y RESULTADOS

Se obtuvieron muestra de sangre de cordón umbilical de partos vaginales a término completo normales de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de la Fundación de Investigaciones Médicas de Oklahoma (OMRF). Se recogieron de 70 a 100 ml de sangre del cordón por parto. Se usó citrato sódico como anticoagulante. Cualquier método apropiado conocido en la técnica para recogida de sangre del cordón es adecuado, tal como el método mostrado en la Patente de Estados Unidos Nº 6.440.110, que se incorpora expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad. Las células CD34⁺ en el sobrenadante de la muestra de sangre se enriquecieron con un kit mini-MACS de aislamiento de CD34 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). La sangre del cordón se mezcló primero con un volumen igual de 6% dextrano 70 en 0,9% cloruro sódico (McGaw, Inc., Irvine, CA). Después de sedimentación de dos a tres horas, se retiraron las células en el sobrenadante, y se lavaron una vez en solución salina balanceada de Hanks (HBSS, Cellgro) que contenía 2 mM EDTA y 0,5% de albúmina de suero humano (ASH). Los glóbulos rojos contaminantes se lisaron en solución lisante FACS (BD Biosciences, San Jose, CA). Las células mononucleares de baja densidad (CMNs) se separaron después de centrifugación en 250 sobre Ficoll-Hypaque (d = 1,077 g/ml). Las células CD34⁺ se purificaron de la fracción de CMN usando el kit mini-MACS de aislamiento de CD34 siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células CD34⁺ aisladas fue de aproximadamente el 96% como lo examinó la citometría de flujo (Figura 1). Después se realizaron los siguientes experimentos.

Verificación por citometría de flujo de que las células CD34⁺ aisladas de sangre del cordón expresan PSGL-1 y que las células CD34⁺ son heterogéneas.

Para este fin, se usó un tinte de triple color. Las células enriquecidas por la clasificación mini-MACS se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-CD34 (mAb, clon AC136 de Miltenyi Biotec) conjugado con FITC, mAb anti-CD38 conjugado con PE (BD Pharmingen, San Diego, CA), y anticuerpo monoclonal anti-PSGL-1 conjugado con Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, CA) después de bloquear el receptor Fc con IgG humano. Después de lavarlas, las células se analizaron por citometría de flujo sobre un FACScan (Becton Dickinson). Los datos se recogieron usando el programa CellQuest. Los hechos dispersores de luz controlados mediante una compuerta se trazaron sobre una escala logarítmica de intensidad de fluorescencia. Virtualmente, todas las células CD34⁺ expresan PSGL-1 (Fig. 2A), y aproximadamente el 30% de las células CD34⁺ tiene baja o ninguna expresión de CD38 (Figura 2B), lo que

representa la sub-población de células primitivas de progenitor. Además, aproximadamente el 25% de las CMHs que no se enlazan con selectina P son CD34⁺ y CD38^{baja/-} (Fig. 3). Estos resultados confirman los datos existentes.

α1,3-fucosilación in vitro de PSGL-1 en células CD34⁺ purificadas.

Para introducir fucosa en O-glicanos núcleo-2 unidos a PSGL-1 u otros ligandos de selectina en células CD34⁺, se trataron 2-4 X 10⁶ células con 1 mM de guanosín difosfato (GDP)-fucosa (Calbiochem), 20 mU/ml α1,3-fucosiltransferasa VI (FT-VI) (Calbiochem), y 10 mM MnCl₂ en 0,5 mL HBSS/1% HSA durante 40 minutos a 37 °C, en una atmósfera que contenía 5% CO₂. Este tratamiento produce fucosilación óptima de PSGL-1 en células CD34⁺ como lo midió el enlace máximo de selectina P, aún dando como resultado una toxicidad mínima de células CD34⁺ como las testadas por tinción con yoduro de propidio (Figura 4).

Medición de epítopes fucosilados en células CD34⁺ y verificación por citometría de flujo que la α1,3-fucosilación in vitro crea epítopes fucosilados en células CD34⁺

Sialil Lewis^x es un epítipo fucosilado. Al incubar con un anti-sLe^x mAb HECA 452 (rata IgM, hibridoma de la Colección Americana de Cultivos Tipo [ATCC]), nosotros examinamos los epítipes sLe^x en las células CD34⁺. El mAb unido se detectó con fragmentos FITC-cabra conjugada F(ab)'2 con rata IgM (Caltag). Como indica la Figura 5A, el 26% de las células CD34⁺ obtenidas de la sangre del cordón expresan bajos o ningún epítipo fucosilado. Estos datos demuestran que un subconjunto de células CD34⁺ no se fucosilan adecuadamente. Para investigar si la α1,3-fucosilación *in vitro* puede crear epítipes fucosilados en las células CD34⁺, nosotros teñimos las células con HECA 452 después del tratamiento de las células CD34⁺ con FT-VI y GDP-fucosa en presencia de Mn²⁺ usando el método descrito anteriormente. Descubrimos que la α1,3-fucosilación *in vitro* aumentó radicalmente los epítipes sLe^x en células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón como lo indica la tinción de HECA 452 (Figura 5B).

Enlace de selectina P- Resultados

Verificación de los perfiles de enlace de selectina P soluble en células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón

Para el ensayo de enlace de selectina P, las células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón, después del bloqueo del receptor FC, se incubaron con anti-CD34-PE y con selectina P aislada de plaquetas humanas. El enlace de selectina P se detectó con S12 etiquetado con FITC, un mAb no bloqueador para selectina P humana. Las incubaciones de las células se realizaron a 4 °C durante 20 min. Se uso una cantidad saturadora de selectina P en los experimentos después de una titulación en serie (Figura 6). En los experimentos de control, las incubaciones de selectina P de las células se realizaron en presencia de G1, un mAb bloqueador para selectina P, PL1, un mAb bloqueador para PSGL-1, o 10 mM EDTA, que elimina las interacciones selectina-ligando dependientes de Ca²⁺. Los análisis de citometría de flujo mostraron que aproximadamente el 27% de las células CD34⁺ (principalmente las que comprenden las células CD38^{baja/-}) no se enlazaron con selectina P, lo que es consistente con los datos previamente publicados (Figura 7A) (Hidalgo, A., Weiss, L. A., y Frenette, P. S. Ligandos funcionales de selectina que median la interacción de célula CD34⁺ humana con endotelio de médula ósea se mejoran postnatalmente. Los recorridos de adhesión que median la conducción de célula progenitora hematopoyética a la médula ósea. J. Clin. Invest. 110:559-569. 2002). La Figura 7C mostró que la selectina P se unió específicamente a PSGL-1 en las células CD34⁺ porque los anticuerpos G1 y P1 y EDTA abolieron el enlace.

Demostración por citometría de flujo de que la α1,3-fucosilación in vitro de la superficie de células CD34⁺ aumenta en enlace con selectina P.

Las células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón se trataron primero con GDP-fucosa y FT-VI como se ha descrito anteriormente, y después se tiñeron con anti-CD34-PE y selectina P. El enlace de selectina P se detectó con mAb S12 etiquetado con FITC. El tratamiento con FT-VI exógeno aumentó de manera significativa el enlace de células CD34⁺ con selectina P humana (Figura 7B). El enlace aumentado con selectina P se debió al mayor PSGL-1 funcional en las células CD34⁺ después de la α1,3-fucosilación porque los anticuerpos G1 y PL1 y EDTA bloquearon el enlace (Figura 7D). Para encontrar las condiciones óptimas para α1,3-fucosilación *in vitro*, se examinaron varios tiempos de incubación y concentraciones de FT-VI, GDP-fucosa y Mn (datos no mostrados). Se eligió una condición (mostrada anteriormente) para todos los experimentos que produjeron fucosilación óptima de PSGL-1 en células CD34⁺ como se midió por el máximo enlace de selectina P (Figura 7B), aún dando como resultado toxicidad mínima para células CD34⁺ como lo testó la tinción con yoduro de propidio (Fig. 4).

Demostración de que la α1,3-fucosilación in vitro aumenta la adhesión de célula CD34⁺ a selectina P en flujo de cizallamiento fisiológico.

Las células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón se dividieron en dos grupos para un proceso adicional. Un grupo se incubó con GDP-fucosa y FT-VI como se ha descrito anteriormente, y otro se trató con FT-VI sin GDP-fucosa (control tratado de manera falsa). La habilidad de enlace con selectina P de los dos grupos de células se comparó usando un sistema de ensayo de circulación con cámara de flujo *in vitro* como se describe más abajo. La selectina P aislada de plaquetas humanas se inmovilizó en una cámara de flujo con placas paralelas. Una densidad de sitio de

selectina P de 145 sitio/ μm^2 se usó como se midió por el enlace de mAb S12 anti-P-selectina etiquetado con I¹²⁵. Las células CD34⁺ derivadas tratadas de manera falsa o las tratadas con FTVI (10⁶/ml en solución salina balanceada de Hanks y 0,5% albúmina humana) se impregnaron sobre selectina P en una tensión de cizallamiento de pared de 1 dyn/cm². El número acumulado de células en circulación se midió con un sistema de video microscopio acoplado a un sistema de análisis de imagen. Las células CD34⁺ circularon de una manera dependiente de Ca⁺⁺ por las interacciones selectina P humana-PSGL-1 porque EDTA y los anticuerpos G1 y PL1 abolieron la circulación, y no se observó circulación sobre las placas cubiertas solamente con albúmina de suero humano (Figura 8). En comparación con las células CD34⁺ tratadas de manera falsa, aproximadamente el triple de células CD34⁺ tratadas con FT-VI circularon sobre selectina P.

Enlace de selectina E- Resultados

Perfiles de enlace de selectina E soluble con CMHs derivadas de SC

Selectina E soluble murina/quimera IgM humana (selectina E/IgM) se usó para el ensayo de enlace de selectina E en fase fluida. La quimera IgM CD45/humana se usó como control negativo. Las células se incubaron con selectina E/IgM después del bloqueo del receptor Fc. El enlace de selectina E se detectó después con anticuerpos monoclonales IgM anti-humano de cabra etiquetados con FITC. Las células también se tiñeron con mAb anti-CD34 etiquetado con PE (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las incubaciones se realizaron a 4 °C durante 20 min. Una cantidad saturada de selectina E se usó en los experimentos después de una titulación en serie. En los experimentos de control, las tinciones se realizaron en presencia de 9A9, un mAb bloqueador para selectina E, o 10 mM EDTA, que elimina las interacciones selectina-ligando dependientes de Ca²⁺. Los análisis de citometría de flujo demostraron que aproximadamente el 25% de las CMHs CD34⁺ no se enlazaron con selectina E (Fig. 9A). La Fig. 9C muestra que la interacción de CMHs CD34⁺ con selectina E fue específica porque mAb 9A9 y EDTA la abolieron.

α 1,3-fucosilación in vitro aumenta el enlace de CMH CD34⁺ con selectina E como lo mide la citometría de flujo

Las CMHs CD34⁺ derivadas de SC se dividieron en dos grupos. Un grupo (2-4 x 10⁶ células) se incubó con 1 mM GDP-fucosa, 20 mU/ml FTVI (Calbiochem), y 10 mM MnCl₂ en 0,5 ml HBSS/1% ASH durante 40 minutos a 37 °C, en una incubadora que contenía 5% CO₂. Otro grupo se incubó con FT-VI sin GDP-fucosa (control tratado de manera falsa). Las células se tiñeron después con anti-CD34 y selectina E/IgM. Después del tratamiento con α 1,3-fucosiltransferasa exógena, el enlace de CMHs CD34⁺ con selectina E aumentó del 75% al 95% (Fig. 9A y B). El enlace aumentado para selectina E fue específico como lo verifican mAb 9A9 y EDTA (Fig. 9D). El enlace residual después del bloqueo de Ab 9A9 y EDTA visto en la Fig. 9C y D fue no específico porque las células teñidas con control negativo CD45/IgM tuvieron un perfil similar (datos no mostrados).

α 1,3-fucosilación in vitro aumenta la adhesión de CMH con selectina E bajo fuerzas de cizallamiento fisiológicas

Las CMHs se dividieron en dos grupos y se fucosilaron como se ha descrito anteriormente. La habilidad de enlace con selectina E de los dos grupos de células se comparó usando un sistema de circulación con cámara de flujo *in vitro*. En resumen, la selectina E humana soluble se inmovilizó en una cámara de flujo con placas paralelas. Una densidad de sitio de selectina E de 200 sitio/ μm^2 se usó como se midió por el enlace de mAb ES1 de selectina E anti-humano etiquetado con I¹²⁵. Las CMHs tratadas de manera falsa o las tratadas con FT-VI (10⁶/ml en HBSS y 0,5% ASH) se impregnaron sobre selectina E bajo diferentes fuerzas de cizallamiento. El número acumulado y la resistencia de cizallamiento de las células en circulación se midieron con un sistema de video microscopio acoplado a un sistema de análisis de imagen. En la fuerzas de cizallamiento examinadas, aproximadamente 2-3 veces más CMHs tratadas con FT-VI circularon sobre selectina E en comparación con las CMHs tratadas de manera falsa (Fig. 10A y B). Las células tratadas con FT-VI también circularon a menor velocidad y fueron más resistentes a la separación por las fuerzas de cizallamiento (Fig. 10C y D). La interacción de CMHs con selectina E fue específica, cuando mAb ES1 abolió la circulación y no se observó circulación sobre placas cubierta solamente por ASH (Fig. 10B). PL1, que bloquea el enlace de selectina P con PSGL-1, no afectó a la circulación de CMH sobre selectina E (Fig. 10B), lo que confirma que la selectina E media la circulación mediante el enlace a otros sitios sobre PSGL-1 u otros ligandos de superficie celular.

Estos resultados indican que la α 1,3-fucosilación *in vitro* aumenta la adhesión de circulación fisiológicamente relevante de células CD34⁺ con selectina P y selectina E bajo flujo.

Ejemplo In Vivo

CMHs fucosiladas muestran un injerto mejorado en médula ósea *in vivo*.

Métodos

Mediante análisis *in vitro*, en el presente documento se ha demostrado que CMHs de SC tratadas con GDP-fucosa y FTVI mostraron un aumento significativo en el enlace en fase fluida con selectina P y selectina E y circularon mucho mejor sobre superficies cubiertas de selectina P y selectina E bajo diferentes fuerzas de cizallamiento de pared, en

comparación con CMHs de SC sin fucosilación. Las CMHs de SC demuestran además en el presente documento que tienen una mejor conducción a e injerto en la médula ósea *in vivo*. Ratones no obesos diabéticos severos con inmunodeficiencia combinada (NOD/SCI) se han establecido correctamente como receptores xenogénicos para estudio *in vivo* de CMHs humanas. Hemos comparado injerto hematopoyético humano en ratones NOD/SCID trasplantados con CMHs de SC con o sin fucosilación.

Ratones machos y hembras libres de patógenos (NOD/SCID) (The Jackson Laboratory), de 4-5 semanas de edad, se usaron como receptores. Los ratones fueron irradiados (230 rad) 2 ó 3 horas antes de las inyecciones intravenosas de CMHs de SC (8×10^6 /ratón en 300 μ l salino) tratadas con FTVI (fucosiladas) o tratadas de manera falsa (tratadas con FTVI pero sin GDP-fucosa), respectivamente. Los ratones de control recibieron cada uno 300 μ l de salino sin CMHs de SC.

Seis semanas después del trasplante, los ratones fueron sangrados y sacrificados. Las células de la médula ósea se aislaron de ambos fémures y se filtraron a través de una malla de 100-mm para extraer los restos. Después de la lisis de los glóbulos rojos, las células nucleadas de la médula ósea de cada ratón se volvieron a suspender en HBSS en una concentración de 1×10^6 /m. El injerto se analizó por ensayo de citometría de flujo y ensayo de progenitor hematopoyético humano. Para la citometría de flujo, las células nucleadas de médula ósea se incubaron con un CD45 mAb anti-humano conjugado con Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, CA).

Para los ensayos de progenitor hematopoyético humano, 1×10^5 células nucleadas de médula ósea por plato de cultivo de 35-mm se colocaron en placas en medio MethoCult H4433 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) por duplicado y se incubaron a 37 °C, 5% CO₂. El total de unidades formadoras de colonias eritroides en ramillete (BFU-E), unidades formadoras de colonias granulocito/macrófago (CFU-GM), y unidades formadoras de colonias granulocito/megacariocito/macrófago (CFU-GEMM) se contabilizaron el día 14 del cultivo y se analizaron. El origen humano de las colonias se confirmó mediante análisis de citometría de flujo de las células recogidas de diferentes colonias teñidas con mAbs con CD45 humano para células mieloides y glicoforina A para células eritroides, respectivamente.

Resultados

Los ratones NOS/SCID irradiados que recibieron CMHs de SC fucosiladas tuvieron 2-3 veces más células hematopoyéticas derivadas de humano positivas CD45 en la médula ósea y sangre periférica que los ratones que recibieron CMHs tratadas de manera falsa, como lo analiza la citometría de flujo (Figura 11A). El injerto significativamente mejorado de progenitores hematopoyéticos humanos en médula ósea de ratones trasplantados con células fucosiladas fue multilinaje como los muestran los aumentos de BFU-Es, CFU-GMs y CFU-GEMMs (Figura 11B). Hay que mencionar que los tamaños de las colonias derivadas de CMHs de SG no fueron diferentes de manera significativa en cualquier grupo de receptores (datos no mostrados), lo que indica que la fucosilación no cambió el crecimiento potencial de progenitores de SC. De este modo, el estudio *in vivo* demostró que las CMHs de SC tratadas con FTVI tiene un potencial mucho más alto para conducirse a e injertarse en médula ósea de ratones NOD/SCID que las células tratadas de manera falsa. Estos resultados demuestran que las CMHs de la presente invención tendrán un injerto mejorado de médula ósea en humanos.

Utilidad

Las CMHs fucosiladas descritas en el presente documento pueden usarse en una variedad de maneras. Por ejemplo, ya que las células son no tratadas (primitivas), pueden usarse para reconstituir completamente la médula ósea de un sujeto irradiado y/o un individuo sometido a quimioterapia.

Entre las condiciones que pueden tratarse mediante la administración de células madre hematopoyéticas de acuerdo con la presente invención están leucemias y linfomas tales como leucemia mielocítica (mielógena) crónica (LMC), leucemia mielógena crónica juvenil (LMCJ), leucemia mielocítica aguda (LMA), linfoma maligno, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, síndrome mielodisplásico (SMD), y enfermedades autoinmunes, por ejemplo.

Otras enfermedades que pueden tratarse con las CMHs tratadas de la presente invención son: enfermedad de Gunther, síndrome de Hunter, síndrome de Hurler, neuroblastoma, linfoma no-Hodgkin, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, y tumores de tejido sólido, tales como cáncer de mama.

En estos tratamientos, las poblaciones de estas CMHs tratadas pueden darse a un paciente cuya médula ósea se haya destruido por terapia ablativa.

Las células de la presente invención pueden administrarse por inyección intravenosa, por ejemplo, o por cualquier otro método apropiado conocido por aquellos expertos en la técnica. En los métodos para tratar un huésped aquejado de una enfermedad o condición, una cantidad terapéuticamente efectiva de CMHs es la cantidad suficiente para reducir o eliminar los síntomas o efectos de la enfermedad o condición. La cantidad terapéuticamente efectiva administrada a un huésped se determinará sobre una base individual y se basará, al menos en parte, en consideración del tamaño del individuo, la severidad de los síntomas a ser tratados, y los resultados que se

busquen. De este modo, un experto en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente efectiva empleando tal práctica en el uso de no más que la experimentación rutinaria. Para información detallada sobre trasplantes de CMHs, puede consultarse *"Hemopoietic Stem Cell Transplantation, Its Foundation and Clinical Practice"* [Modern Medicine, Publicación Especial, 53, 2, 1998].

Al preparar la dosis de células madre fucosiladas que se administrarán, puede utilizarse una variedad de transportadores farmacéuticamente aceptables. El transportador, diluyente o vehículo puede contener un agente tampón para obtener un pH fisiológicamente aceptable, tal como salino amortiguado con fosfato, y/u otras sustancias que son fisiológicamente aceptables y/o seguras para su uso. En general, el material para inyección intravenosa en humanos debería cumplir las regulaciones establecidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos, que están disponibles para aquellos en el campo. Los transportadores farmacéuticamente aceptables pueden combinarse, por ejemplo, en una proporción volumen 1: volumen 1, con la composición de CMH tratada. El transportador puede ser por ejemplo, medio M199 o RPMI 1640. Además, al preparar dicha dosis, también pueden emplearse varias infusiones de uso común hoy. En una realización, puede emplearse la cantidad de dosis convencionalmente usada en el trasplante de CMHs. La dosis puede ser, por ejemplo, aproximadamente $.01-10 \times 10^8$ CMNs tratadas/kg de peso (que incluye CMHs CD38^{baja/-} u otras CMHs tratadas como las definidas en otra parte en el presente documento) del paciente, o más, o menos donde sea apropiado.

Como se describe en el presente documento, la presente invención contempla un método de mejora del enlace con la selectina P o selectina E de las CMHs de la sangre del cordón que comprende el tratamiento de una cantidad de CMHs, al menos una parte de las CMHs careciendo de o teniendo una expresión reducida de proteína de superficie CD38, *in vitro* con una $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa y un donante de fucosa que forman las CMHs tratadas, donde las CMHs tratadas han aumentando el enlace con selectina P y selectina E. En una realización, la parte de CMHs que carece de o tiene una expresión reducida de proteína de superficie CD38 tiene una reducida habilidad de conducción a la médula ósea. Las CMHs se derivan de sangre del cordón umbilical humano, y pueden ser una cantidad no fraccionada de sangre del cordón umbilical humano. La parte de CMHs que carece de o tiene una expresión reducida de proteína de superficie CD38 comprende PSGL-1 u otras estructuras que tienen glicanos no fucosilados u O-glicanos no fucosilados. En el método presente, la parte de CMHs que carece de o tiene una expresión reducida de proteína de superficie CD38 puede comprender PSGL-1 que tiene O-glicanos núcleo-2 que comprende NeuAc $\alpha 2,3$ Gal $\beta 1,4$ GlcNAc y que carecen de una fucosa en la unión $\alpha 1,3$ con el GlcNAc o que comprenden otros glicanos que carecen de fucosilación apropiada. En una realización, al menos el 50% de las CMHs tratadas tiene fluorescencia de enlace de selectina P que excede un umbral de fluorescencia predeterminado en un ensayo de enlace de selectina P o fluorescencia de enlace de selectina E que excede un umbral de fluorescencia predeterminado en un ensayo de enlace de selectina E (como se describe en otra parte en el presente documento). En el método presente, la $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa puede ser una $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa IV, una $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa VI o una $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa VII. Además, el donante de fucosa puede ser GDP-fucosa.

La presente invención contempla además una composición de CMHs que comprende CMHs CD34⁺ derivadas de sangre del cordón umbilical que carecen de o tiene expresión reducida de proteína de superficie CD38, donde al menos el 10% de las CMHs CD34⁺ se enlazan con selectina P (o selectina E), y un transportador farmacéuticamente aceptable. En la composición, en realizaciones alternativas, al menos el 25%, 50%, 75%, 90% o 95% de las CMHs CD34⁺ se enlazan con selectina P (o selectina E).

La presente invención también contempla el tratamiento de un sujeto con una enfermedad hematológica u otra condición que requiera un trasplante de CMHs administrando una cantidad de la composición de CMHs tratadas descritas en el presente documento al sujeto que tiene una enfermedad hematológica u otra condición que requiera un trasplante de CMHs. La enfermedad hematológica puede ser, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, mielodisplasia, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena crónica juvenil o anemia de células falciformes.

Además, la presente invención contempla un producto de sangre que comprende una población de CMHs que comprende células caracterizadas como CD34⁺CD38^{baja/-}, donde al menos el 10% de las CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} se enlaza con selectina P o selectina E. En el producto de sangre, en realizaciones alternativas, al menos el 25%, 50%, 75%, 90% o 95% (o cualquier porcentaje incluido) de las CMHs CD34⁺CD38^{baja/-} se enlaza con selectina P o selectina E. En el producto de sangre, las CMHs humanas se derivan de sangre del cordón umbilical humano. El producto de sangre también puede comprender un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable, y puede también comprender una fucosiltransferasa libre o una fucosiltransferasa unida a un soporte.

La presente invención también contempla un producto de sangre producido por el método que comprende proporcionar una cantidad de CMHs, al menos una parte de las CMHs careciendo de o teniendo una expresión reducida de proteína de superficie CD38, y tratar la cantidad de CMHs *in vitro* con una $\alpha 1,3$ -fucosiltransferasa y un donante de fucosa para producir CMHs tratadas, donde al menos el 20% de las CMHs tratadas se enlazan con selectina P o selectina E. En una realización alternativa al menos el 25%, 50%, 75%, 90% o 95% (o cualquier porcentaje incluido) de las CMHs tratadas del producto de sangre se enlaza con selectina P o selectina E. En el producto de sangre, la cantidad de CMHs se deriva de sangre del cordón umbilical humano.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar el enlace con selectina P o selectina E de células madre hematopoyéticas (CMHs) de sangre del cordón umbilical que tienen un enlace disminuido con selectina P o selectina E, que comprende:
5 tratar una cantidad de CMHs, teniendo al menos una parte de ellas un enlace disminuido con selectina P o selectina E y que se caracterizan por el ligando-1 de glicoproteína de selectina P (PSGL-1) que carece de una α 1,3-fucosa, *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa que forman CMHs fucosiladas, donde las CMHs fucosiladas han mejorado el enlace con selectina P o selectina E.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 donde al menos una parte de la cantidad no tratada de CMHs carecen de o tienen una expresión reducida de proteína de superficie CD38.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde una parte de la cantidad no tratada de CMHs tiene una habilidad reducida de conducción a la médula ósea.
- 15 4. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde una parte de la cantidad no tratada de CMHs expresa PSGL-1 que tiene glicanos no fucosilados u O-glicanos no fucosilados.
- 20 5. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde una parte de la cantidad no tratada de CMHs expresa PSGL-1 que tiene O-glicanos núcleo-2 que comprenden NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc y que carecen de una fucosa en la unión α 1,3 con el GlcNAc o que comprenden otros glicanos que carecen de fucosilación apropiada.
- 25 6. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde en la etapa de tratar la cantidad de CMHs, al menos el 50% de las CMHs tratadas tienen fluorescencia de enlace con selectina P que excede un umbral de fluorescencia predeterminado en un ensayo de selectina P o que tienen fluorescencia de enlace con selectina E que excede un umbral de fluorescencia predeterminado en un ensayo de selectina E.
- 30 7. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde en la etapa de tratar la cantidad de CMHs, la α 1,3 fucosiltransferasa es una α 1,3 fucosiltransferasa IV, una α 1,3 fucosiltransferasa VI, o una α 1,3 fucosiltransferasa VII.
8. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde en la etapa de tratar la cantidad de CMHs, el donante de fucosa es GDP-fucosa.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde las CMHs no tratadas se derivan de sangre del cordón umbilical.
10. El método de la reivindicación 9 donde la sangre del cordón umbilical humano es una cantidad no fraccionada de sangre del cordón umbilical humano.
- 40 11. Una composición de CMHs de sangre del cordón umbilical, que comprende:
CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical que carecen de o tienen una expresión reducida de proteína de superficie CD38;
donde las CMHs de sangre del cordón umbilical se han fucosilado *in vitro* de tal manera que al menos el 10% de las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlazan con selectina E o selectina P; y
45 un transportador, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La composición de la reivindicación 11 donde las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se han fucosilado con una α 1,3-fucosiltransferasa.
- 50 13. La composición de la reivindicación 11 ó 12 donde al menos el 25% del las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlaza con selectina P o selectina E.
14. La composición de la reivindicación 11 ó 12 donde al menos el 50% del las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlaza con selectina P o selectina E.
- 55 15. La composición de la reivindicación 11 ó 12 donde al menos el 75% del las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlaza con selectina P o selectina E.
16. La composición de la reivindicación 11 ó 12 donde al menos el 90% del las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlaza con selectina P o selectina E.
- 60 17. La composición de la reivindicación 11 ó 12 donde al menos el 95% del las CMHs CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se enlaza con selectina P o selectina E.
- 65 18. CMHs de sangre del cordón umbilical de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11-17 para su uso en el tratamiento de una enfermedad hematológica, una enfermedad autoinmune, enfermedad de Gunther,

síndrome de Hunter, síndrome de Hurler, neuroblastoma, linfoma no-Hodgkin, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X, tumores de tejido sólido, cáncer de mama, o para reconstituir la médula ósea en un sujeto irradiado o un individuo sometido a quimioterapia, o para tratar un paciente cuya médula ósea se haya destruido por terapia ablativa.

- 5
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- 19.** CMHs de sangre del cordón umbilical de la composición de la reivindicación 18 donde la enfermedad hematológica es una de leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, mielodisplasia, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena crónica juvenil, anemia aplásica grave o anemia de células falciformes.
- 20.** Un producto de sangre que contiene CMHs de sangre del cordón umbilical que comprende: una población de CMHs de sangre del cordón umbilical fucosiladas que comprenden células caracterizadas como $CD34^+CD38^{baja/-}$, donde las CMHs de sangre del cordón umbilical se han fucosilado *in vitro* de tal manera que al menos el 10% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlazan con selectina P o selectina E.
- 21.** El producto de sangre de la reivindicación 20 que además comprende un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 22.** El producto de sangre de las reivindicaciones 20 ó 21 que además comprende una fucosiltransferasa libre o una fucosiltransferasa unida a un soporte.
- 23.** El producto de sangre de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde al menos el 25% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlaza con selectina P o selectina E.
- 24.** El producto de sangre de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde al menos el 50% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlaza con selectina P o selectina E.
- 25.** El producto de sangre de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde al menos el 75% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlaza con selectina P o selectina E.
- 26.** El producto de sangre de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde al menos el 90% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlaza con selectina P o selectina E.
- 27.** El producto de sangre de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 donde al menos el 95% de las CMHs $CD34^+CD38^{baja/-}$ se enlaza con selectina P o selectina E.
- 28.** Un método para mejorar el enlace con selectina P o selectina E de células madre hematopoyéticas (CMHs) de sangre del cordón umbilical que tienen un enlace disminuido con selectina P o selectina E, que comprende: tratar una cantidad de CMHs que comprenden PSGL-1 que tiene O-glicanos núcleo-2 que comprende NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc que carecen de fucosa en la unión α 1,3 con el GlcNAc y que tienen un enlace disminuido con selectina P o selectina E *in vitro* con una α 1,3-fucosiltransferasa y un donante de fucosa para producir CMHs fucosiladas donde al menos el 10% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.
- 29.** El método de la reivindicación 28 donde al menos una parte de la cantidad no tratada de CMHs carecen de o tienen una expresión reducida de proteína de superficie CD38.
- 30.** el método de la reivindicación 28 ó 29 donde la cantidad de CMHs está dispuesta dentro de un transportador, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 31.** El método de una cualquiera de las reivindicación 28-30 que comprende el uso de una fucosiltransferasa libre o una fucosiltransferasa unida a un soporte para tratar las CMHs.
- 32.** El método de una cualquiera de las reivindicación 28-31 donde la cantidad de CMHs se deriva de sangre del cordón umbilical humano.
- 33.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 28-32 donde al menos el 25% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.
- 34.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 28-33 donde al menos el 50% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.
- 35.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 28-34 donde al menos el 75% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.
- 36.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 28-35 donde al menos el 90% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 28-36 donde al menos el 95% de las CMHs fucosiladas se enlaza con selectina P o selectina E.

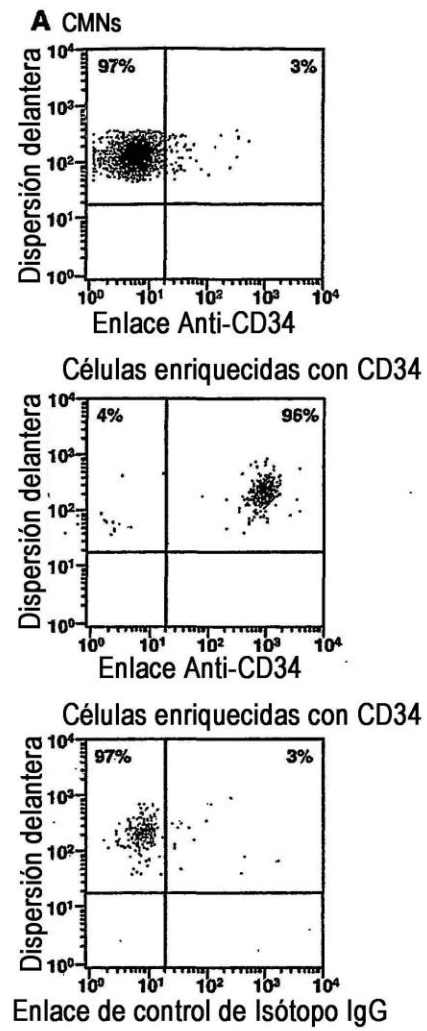


Figura 1

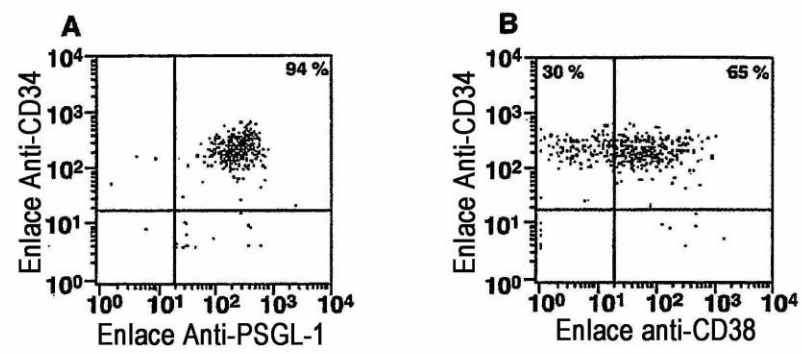


Figura 2

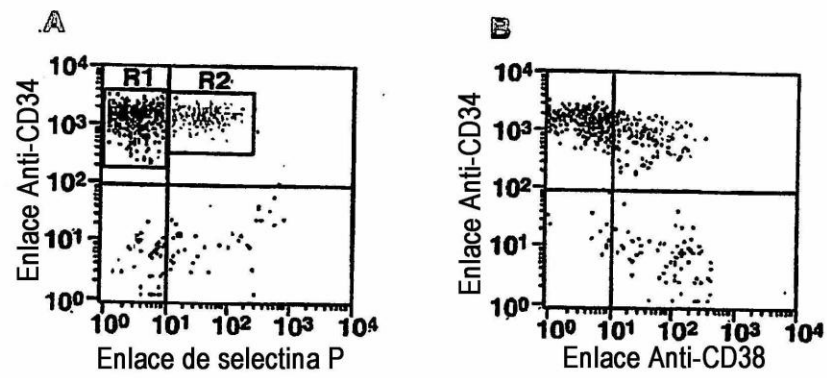


Figura 3

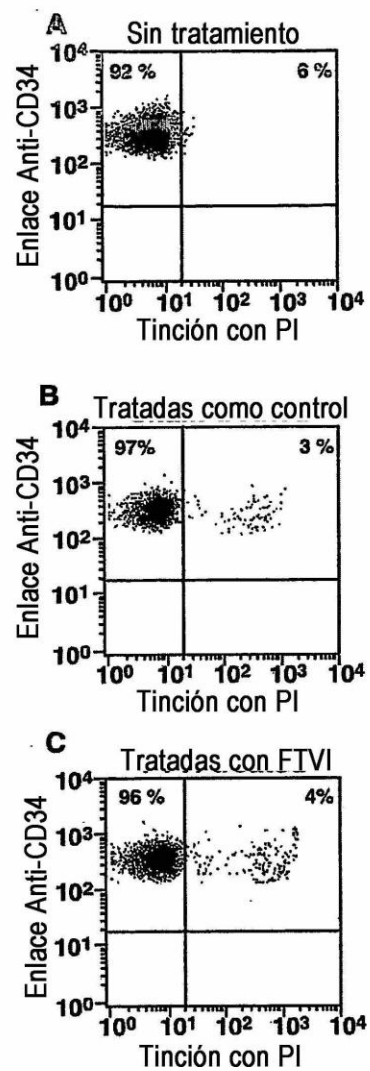


Figura 4

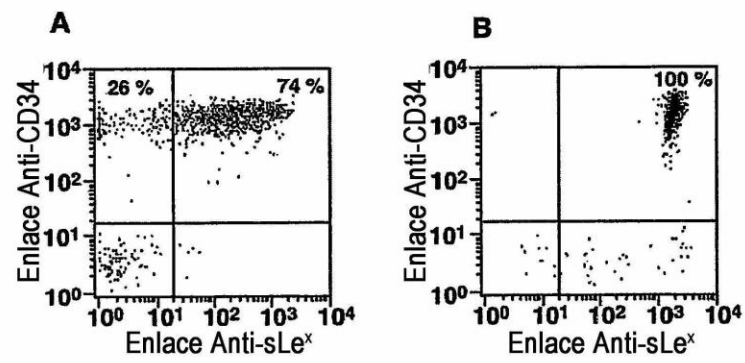


Figura 5

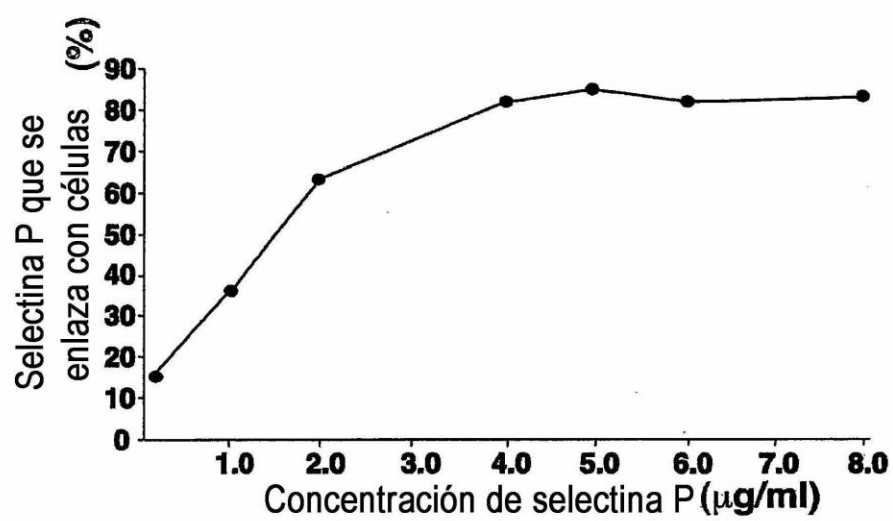


Figura 6

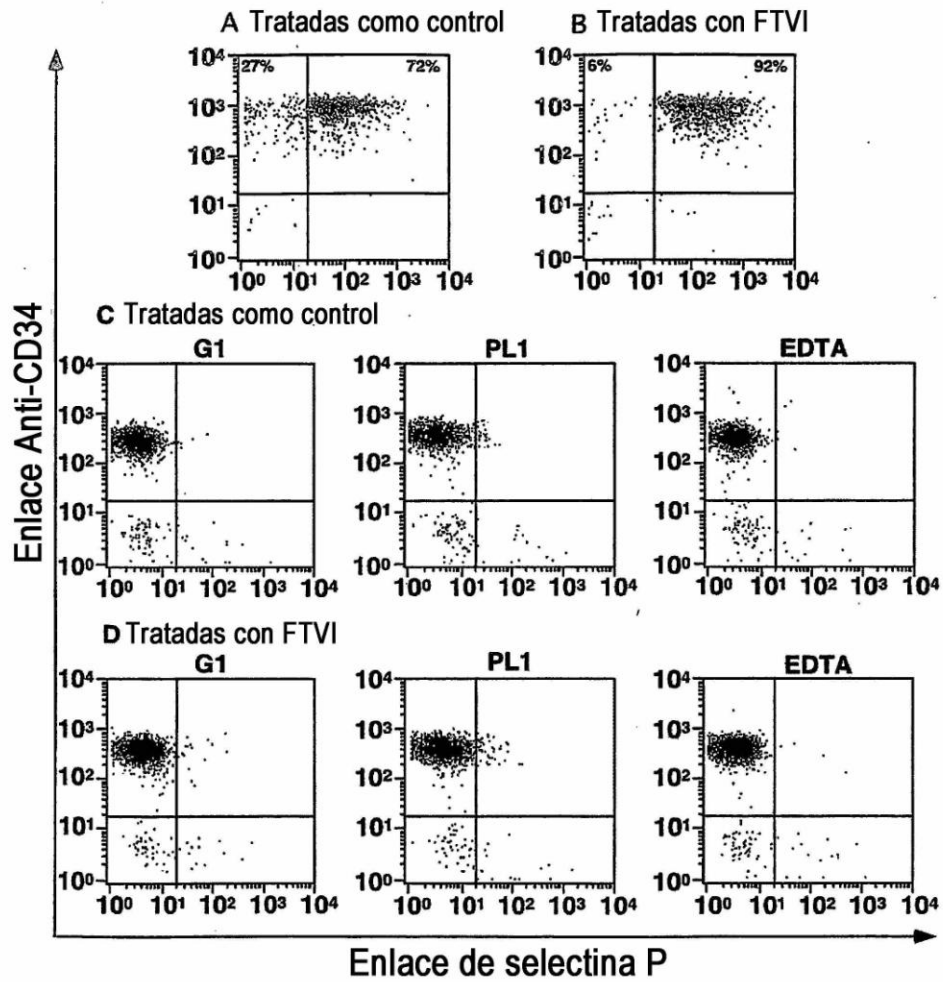


Figura 7

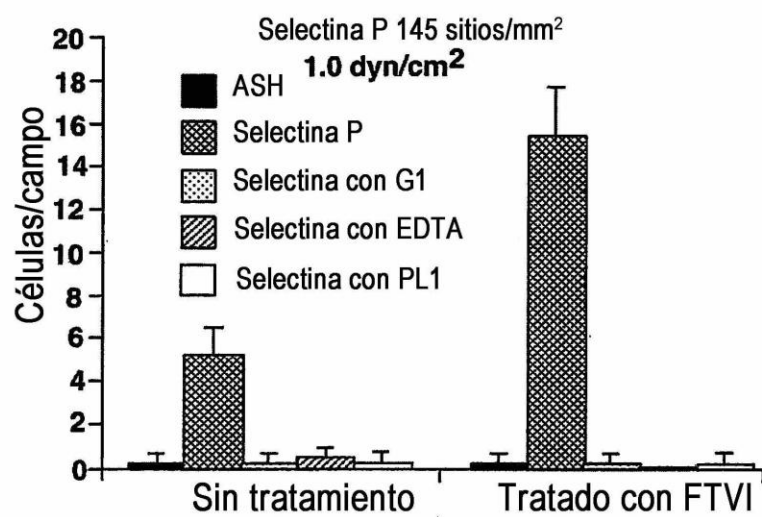


Figura 8

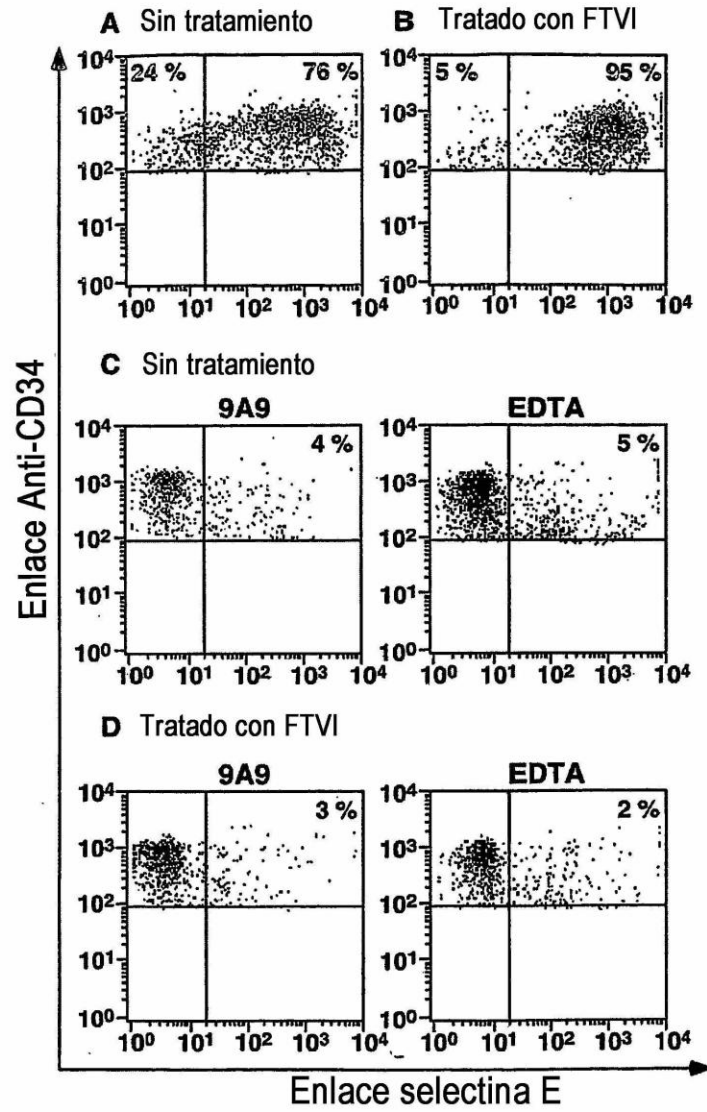


FIGURA 9

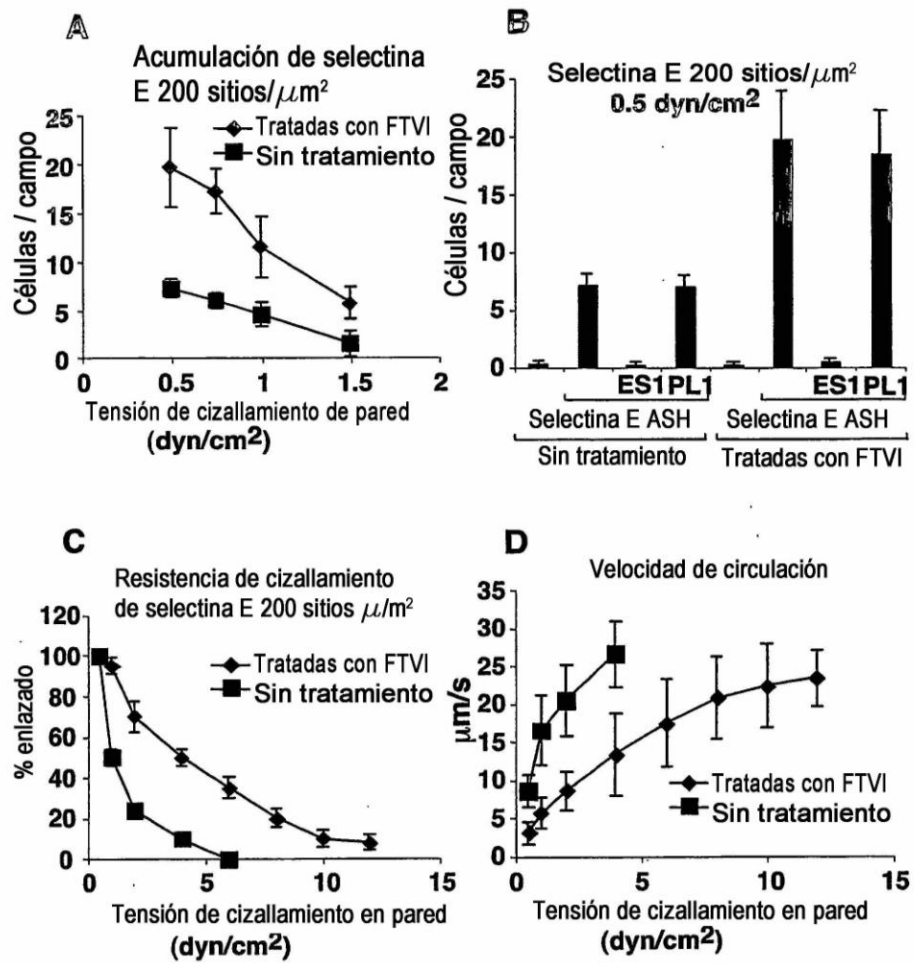


Figura 10

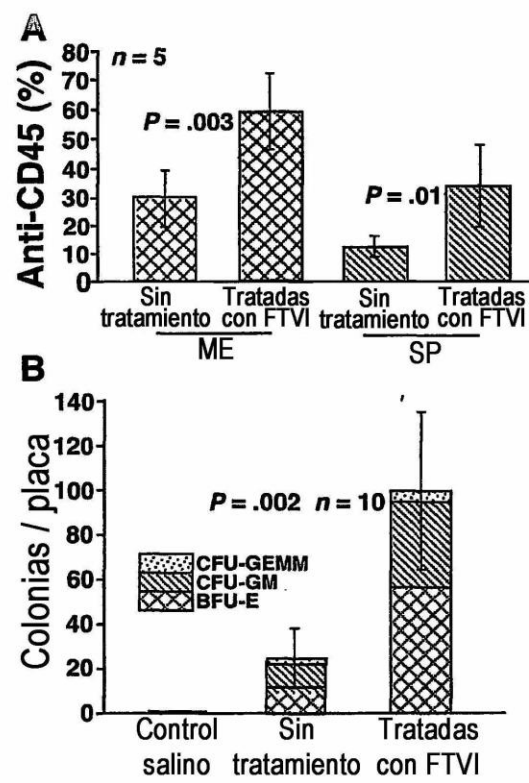


Figura 11