

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 724**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2004 E 04799327 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 1682653**

54 Título: **Células madre hematopoyéticas adecuadas para el trasplante, su preparación y composiciones farmacéuticas que las comprenden**

30 Prioridad:

13.11.2003 IL 15886803

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**LAPIDOT, TSVEE y
KAHN, JOY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 724 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 adecuadas para el trasplante, su preparación y composiciones farmacéuticas que las comprenden

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a células madre hematopoyéticas adecuadas para el trasplante y a métodos para su preparación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Procesos de trasplante clínicos y experimentales de células madre hematopoyéticas (HSC) imitan el proceso fisiológico de la migración de HSC de la circulación a la médula ósea (BM) que se produce durante el desarrollo embrionario tardío y la hematopoyesis en estado estacionario en adultos a lo largo de la vida¹⁻³. La transferencia de genes en HSC humanas puede servir como una herramienta prometedora en la corrección de una amplia diversidad de trastornos hematopoyéticos y genéticos. Los trasplantes de HSC se pueden utilizar para suministrar de forma duradera estas células genéticamente modificadas a la BM, que a su vez liberarán células maduras con el gen corregido en la circulación a lo largo de la vida.

15 Una eficacia incrementada del injerto de células madre podría mejorar el resultado de los trasplantes clínicos, así como los protocolos de terapia génica, y podría conseguirse mediante la modulación de la capacidad de las células madre de alojarse y repoblar la BM receptora. Para este fin, es necesaria una mejor comprensión de los mecanismos que regulan estos procesos.

20 Las interacciones entre el factor derivado de estroma 1 (SDF-1) de quimioquinas, al que también se alude como CXCL12, y su receptor CXCR4 desempeñan un papel esencial en la siembra de células madre de la BM durante el desarrollo embrionario murino^{10,11}. Previamente, los autores de la invención fueron capaces de demostrar, utilizando ratones NOD/SCID inmunodeficientes como receptores, que tanto la migración (traslado) in vivo a corto plazo como el alto nivel de repoblación multilínea de la médula ósea murina por parte de células CD34⁺ enriquecidas humanas dependen de interacciones SDF-1/CXCR4¹²⁻¹⁵. En apoyo de estos datos se ha demostrado que altos niveles de expresión de CXCR4 en células CD34⁺ humanas, o una alta motilidad direccional in vitro inducida por SDF-1 se correlaciona con una recuperación más rápida en trasplantes clínicos tanto alogénicos como autólogos con selección positiva de células CD34^{+16,17}.

30 La expresión de CXCR4 es un proceso dinámico, que está regulado por factores medioambientales tales como citoquinas, quimioquinas, células del estroma, moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas¹⁸. En células madre y progenitoras hematopoyéticas de origen humano, CXCR4 puede supra-regularse a partir de agrupaciones intracelulares mediante cultivo a corto plazo (~ 40 h) in vitro de citoquinas^{13,19} o estimulación de CD34⁺ de la sangre del cordón umbilical (CB) con enzimas proteolíticas tales como MMP-2 y MMP-9²⁰. Esto potencia subsiguientemente su migración in vitro hacia un gradiente de SDF-1¹³, así como sus capacidades de traslado y de repoblación in vivo en ratones NOD/SCID trasplantados y ratones NOD/SCID β2mnull trasplantados en serie^{12,13}, enlazando la auto-renovación de células madre y el desarrollo con la motilidad. Un informe reciente ha demostrado que períodos de cultivo más largos con un cóctel de citoquinas resulta en una disminución de la expresión de CXCR4 en la superficie de la célula en células del CB²² enriquecidas en CD34⁺ y la repoblación reducida se documentó con progenitores humanos cultivados in vitro durante períodos²³ más largos. Recientemente, los autores de la presente invención demostraron que células del CB clasificadas CD34⁺/CXCR4⁺ albergan bajos niveles de CXCR4 intracelular, que, después de la estimulación de citoquinas in vitro a corto plazo, rápidamente se pueden expresar funcionalmente en la superficie celular para mediar en el traslado dependiente de SDF-1 y en la repoblación de ratones NOD/SCID trasplantados¹⁵.

45 Además de su papel central en la mediación de la migración direccional de células madre humanas y murinas²⁴, las interacciones SDF-1/CXCR4 también están implicados en otras funciones de células madre. De manera importante, las interacciones SDF-1/CXCR4 también están involucradas en la retención de células madre y progenitoras en la BM^{10,32,33}. Esta hipótesis también ha sido confirmada por otros estudios que demostraron la implicación de interacciones SDF-1/CXCR4 en el anclaje de HSC humanas inyectadas directamente en el en la cavidad de la BM murina^{34,35}. La interferencia de estas interacciones induce la liberación/movilización de progenitores tanto humanos como murinos de la BM en la circulación³⁶⁻⁴¹.

50 Ratones transgénicos que sobre-expresan CD4 y CXCR4 humanas en sus células T CD4⁺ tienen niveles incrementados de estas células en su BM y sólo niveles muy bajos en la circulación⁴². Por lo tanto, la sobre-expresión de CXCR4 en células progenitoras CD34⁺ humanas puede facilitar su traslado y potencial repoblación.

55 Se han utilizado vectores lentivirales para introducir transgenes en células de repoblación SCID (SRCs)⁴³⁻⁴⁶, debido a su capacidad única de transducir células no en división⁴⁷. Además, se realizó un avance clínico significativo en la terapia génica en pacientes con inmunodeficiencia grave combinada (SCID)-X1 humana que resulta en una corrección completa del fenotipo de la enfermedad^{48,49}, demostrando que la terapia génica puede funcionar en la

práctica. Sin embargo, existe una evidencia emergente para un traslado deficiente⁸ y un bajo injerto⁹ de células CD34⁺ humanas retroviralmente transducidas.

5 Está bien documentado que bajas concentraciones de SDF-1 en sinergia con otras citoquinas de acción temprana potencian la proliferación tanto de células CD34⁺ humanas como células madre y progenitoras murinas, lo que sugiere un papel de esta quimioquina en la supervivencia de células progenitoras²⁵⁻²⁹, mientras que altos niveles de SDF-1 inducen la quiescencia de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTCIC) humanas proliferantes y células madre CD34⁺ del hígado fetal humanas primitivas capaces de repoblación en serie de ratones NOD/SCID trasplantados^{30,31}.

10 Una de las desventajas del trasplante de BM son los niveles reducidos de larga duración de progenitores inmaduros tales como las células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTCIC), (reducción de 1 log) en la BM de pacientes trasplantados en comparación con individuos sanos³⁻⁷.

15 Células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) son progenitores hematopoyéticos capaces de generar células unidades formadoras de colonias (CFU) después de 5 a 8 semanas (35 a 60 días) de cultivo en estroma de médula ósea (BM) y representan progenitores actualmente detectables *in vitro*. Se ha informado que cultivos a largo plazo iniciados con células CD38⁺CD34⁻ de BM humana o sangre del cordón umbilical son capaces de seguir generando CFU durante al menos 100 días, es decir, más allá del período de LTC-IC estándar. Se utilizaron cultivos monocelulares de sangre de cordón umbilical individual para estudiar si la subpoblación de células CD34⁺CD38⁻ es capaz de generar CFU más allá de 60 días ("células iniciadoras de cultivo a largo plazo extendido" o ELTC-IC). A diferencia de LTC-IC de la sangre del cordón umbilical, ELTC-IC proliferan más tarde en el cultivo y son una población progenitora más quiescente. ELTC-IC genera de tres a cuatro veces más progenie que lo hacía LTC-IC (P < 0,002). Se trata de una jerarquía funcional de progenitores en cultivo a largo plazo, que se correlaciona con su grado de quiescencia. (Blood. 1 de noviembre de 1996; 88(9): 3306-13 Crooks GM et al.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los siguientes puntos:

25 1. Un método *in vitro* para preparar una población de células que comprende células madre hematopoyéticas enriquecidas con progenitores primitivos inmaduros, comprendiendo el método introducir en las células madre recogidas un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.

30 2. El método de acuerdo con el punto 1, en el que la población de células exhibe una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o menor que aproximadamente 50 ng/ml.

3. El método de acuerdo con el punto 1, en el que la población de células exhibe una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml.

35 4. El método de acuerdo con el punto 1, en el que la población de células exhibe una reducción en la desensibilización por parte de SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml.

5. El método de acuerdo con el punto 1, en el que los progenitores primitivos inmaduros son del linaje CD34⁺/CD38^{low}.

40 6. El método de acuerdo con el punto 1, en el que las células madre se recogieron después de haber inducido un proceso de movilización de células madre y/o mediante un proceso quirúrgico.

7. El método de acuerdo con el punto 1, que comprende, además, aislar mediante FACS células madre que tienen niveles de CXCR4 por encima de un umbral predeterminado.

8. El método de acuerdo con el punto 1, en el que las células madre son capaces de diferenciarse hacia los linajes mieloide y eritroide.

45 9. El método de acuerdo con el punto 5, en el que la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{low} es aproximadamente 1-5% de la población.

10. El método de acuerdo con el punto 5, en el que los progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{low} están en una cantidad igual o superior a aproximadamente 3% de la población.

50 11. Una población de células que comprende células madre hematopoyéticas enriquecidas con progenitores primitivos inmaduros, que exhiben una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 que es igual a o menor que aproximadamente 50 ng/ml, o que es igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml, preparada al introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4, dando como resultado una sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.

ES 2 534 724 T3

12. La población de células de acuerdo con el punto 11, que es capaz de diferenciar hacia los linajes mieloide y eritroide.
13. La población de células de acuerdo con el punto 11, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros son del linaje CD34⁺/CD38^{-low}.
- 5 14. La población de células de acuerdo con el punto 13, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente 1-5% de la población.
15. La población de células de acuerdo con el punto 13, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente o superior a 3% de la población.
- 10 16. Uso de una población de células que comprende células madre hematopoyéticas de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, en la fabricación de un medicamento para aumentar el traslado de las células madre hematopoyéticas a un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
17. Uso de una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, en la fabricación de un medicamento para aumentar la repoblación de un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- 15 18. El uso de acuerdo con los puntos 16 ó 17, en donde dicho tejido diana se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, vasos sanguíneos, corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, sistema nervioso, piel, hueso y músculo esquelético.
19. Uso de una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, en la fabricación de un medicamento para facilitar el trasplante.
20. El uso de acuerdo con el punto 19, en donde dicho trasplante sigue protocolos de quimioterapia.
- 20 21. El uso de acuerdo con el punto 19, en donde dicho trasplante es autólogo.
22. El uso de acuerdo con el punto 21, en donde el trasplante implica la movilización de células autólogas.
23. El uso de acuerdo con el punto 19, en donde el trasplante es heterólogo.
24. El uso de acuerdo con el punto 19, en donde el trasplante se lleva a cabo con células madre movilizadas.
- 25 25. Una población de células que comprende células madre hematopoyéticas de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para uso en aumentar el traslado de las células madre hematopoyéticas a un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
26. Una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para uso en aumentar la repoblación de un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- 30 27. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 25 ó 26, en donde dicho tejido diana se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, vasos sanguíneos, corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, sistema nervioso, piel, hueso y músculo esquelético.
28. Una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para uso en facilitar el trasplante.
29. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 28, en donde el trasplante sigue protocolos de quimioterapia.
- 35 30. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 28, en donde dicho trasplante es autólogo.
31. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 30, en donde el trasplante implica la movilización de células autólogas.
- 40 32. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 28, en donde el trasplante es heterólogo.
33. La población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para el uso de acuerdo con el punto 28, en donde el trasplante se lleva a cabo con células madre movilizadas.
- 45 34. Un método *in vitro* para preparar una población de células que comprenden células madre hematopoyéticas que exhiben CXCR4 con un epítipo 6H8 intacto, comprendiendo el método introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.

35. Una población de células que comprenden células madre hematopoyéticas que comprenden un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparado al introducir un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4 en las células madre, dando como resultado la sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.
- 5 36. Uso de una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, en la fabricación de un medicamento para el trasplante.
37. Una población de células de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11-15, para uso en el trasplante.
38. Una composición farmacéutica que comprende una población de células hematopoyéticas que comprenden células madre que exhiben un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparado al introducir un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4 en las células madre, dando como resultado la sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.
- 10 En una realización adicional de la invención, la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente 1-5% de la población.
- En una realización adicional de la invención, la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es igual o superior a aproximadamente 3% de las células madre.
- 15 En una realización adicional de la invención, la concentración de SDF-1 es igual a o menor que aproximadamente 50 ng/ml.
- En una realización adicional de la invención, la señalización mejorada se manifiesta por un refuerzo de la migración de células mediada por una baja concentración de SDF-1.
- 20 En otra realización adicional de la invención, la señalización mejorada se manifiesta por un refuerzo de la proliferación de células mediada por una baja concentración de SDF-1.
- En una realización adicional de la invención, la alta concentración de SDF-1 es igual o superior a aproximadamente 1 microgramo/ml.
- En una realización adicional de la invención, la mejora de la señalización se manifiesta por una reducción en la desensibilización por SDF-1.
- 25 En un aspecto, la invención proporciona una población de células que comprenden células madre que comprende una alta cantidad de progenitores primitivos inmaduros, y que exhiben una capacidad de señalización de CXCR4 mejorada en respuesta a concentraciones bajas y/o altas de SDF-1, preparada al introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.
- En una realización de la invención, las células madre son células madre hematopoyéticas.
- 30 En una realización adicional de la invención, la población de células es capaz de diferenciarse hacia linajes mieloide y eritroide.
- En una realización adicional de la invención, las células madre hematopoyéticas son células madre enriquecidas en CD34⁺.
- En una realización adicional de la invención, los progenitores primitivos inmaduros son del linaje CD34⁺/CD38^{-low}.
- 35 En una realización adicional de la invención, la cantidad de CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente 1-5% de la población.
- En una otra realización adicional de la invención, la cantidad de CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente y superior a 3% de la población.
- 40 En una realización adicional de la invención, la baja concentración de SDF-1 es aproximadamente e inferior a 50 ng/ml.
- En una realización adicional de la invención, la alta concentración de SDF-1 es igual o superior a aproximadamente 1 microgramo/ml.
- En otro aspecto, la invención proporciona el uso de la población de células de la invención en la fabricación de un medicamento para aumentar el traslado de células madre a un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- 45 También, la invención proporciona el uso de la población de células de la invención en la fabricación de un medicamento para aumentar la repoblación de las células en un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- En una realización de la invención, el tejido diana se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, vasos sanguíneos, corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, sistema nervioso, piel, hueso y músculo esquelético.

En una realización de la invención, la población de células de la invención se utiliza para facilitar el trasplante.

En una realización adicional de la invención, el trasplante sigue protocolos de quimioterapia.

En otra realización adicional de la invención, el trasplante es autólogo.

En otra realización adicional de la invención, el trasplante implica la movilización de células autólogas.

5 En otra realización adicional de la invención, el trasplante es heterólogo.

En otra realización adicional de la invención, el trasplante se realiza con células madre movilizadas.

Además, la invención proporciona un método de tratar un trastorno en un sujeto, que requiere de reemplazo de células o tejidos, comprendiendo el método proporcionar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células de acuerdo con la invención.

10 También, la invención proporciona un método para preparar una población de células que comprenden células madre que exhiben CXCR4 con un epítipo 6H8 intacto, el método comprende recoger células madre e introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.

En otro aspecto, la invención proporciona una población de células que comprenden células madre que comprenden un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparado al introducir un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4 en las células madre, y el uso de la población de células en la fabricación de un medicamento para el trasplante en un sujeto que lo necesita.

15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para tratar un trastorno que requiere el reemplazo de células o tejidos, el método comprende proporcionar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células de acuerdo con la invención.

20 También, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una población de células que comprende células madre que exhiben un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparada al introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La invención se describe en esta memoria, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que se acompañan. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con motivo de proporcionar lo que se piensa es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace intento alguno de mostrar detalles estructurales de la invención con mayor detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada junto con los dibujos para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las varias formas de la invención.

En los dibujos:

35 La FIG. 1 muestra una representación esquemática de las construcciones de vectores lentivirales. Sólo se representan las partes relevantes de los provirus integrados. Se utiliza el promotor EF1- α para impulsar la expresión del ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP) en el vector de control (panel superior) o la casete bicistrónica CXCR4-IRES-GFP del vector experimental (panel inferior). SD = donante de corte y empalme, SA = aceptor de corte y empalme, pA = señal de poliadenilación, SIN = vector auto-inactivante.

40 La FIG. 2 muestra la expresión de CXCR4 en la superficie celular en células CD34+ humanas transducidas de modo lentiviral. Después de una pseudo-infección o infección lentiviral, células CD34+ de la sangre del cordón umbilical (CB) y de la sangre periférica movilizada (MPB) fueron analizadas mediante citometría de flujo en cuanto a la expresión de GFP solo o de GFP junto con la expresión de CXCR4 utilizando un anticuerpo anti-hCXCR4-PE. **A.** Los datos muestran un análisis FACS representativo de células CD34+ del CB. Los números indican el porcentaje de células CD34+ totales. Dispersión frontal (FSC) indicativa del tamaño de la célula. **B.** Los resultados indican el porcentaje de células CD34+ de CB y MPB que expresan CXCR4 y representan la media \pm ET de 7 experimentos independientes. * $p < 0,01$ en comparación las células control infectadas por GFP. **C.** Detección por inmunofluorescencia de la expresión de CXCR4 de la superficie celular (panel superior) e intracelular (panel inferior) de células transducidas con GFP (GFP), transducidas con CXCR4 (CXCR4) o células control de isotipo.

50 La FIG. 3 muestra el contenido de progenitor clonogénico de células CD34+ de CB transducidas. Células CD34+ de CB transducidas lentivirales fueron sembradas en cultivo de metilcelulosa semisólido. **A.** Colonias de células formadoras de colonias (CFC) GFP+ se analizaron por microscopía de contraste de fase el día 14. El panel superior indica colonias BFU-E (a) y CFU-GM (b) de células transducidas de vector de control. El panel inferior indica BFU-E (c) y CFU-GM (d) de células transducidas con CXCR4. Se muestra un experimento representativo. **B.** Los datos indican el número total de colonias CFU-GM y BFU-E. Los números por encima de las barras indican el porcentaje

de colonias GFP+ de colonias totales. Las barras representan la media \pm ET de tres experimentos independientes. * $p = 0,004$ en comparación con colonias BFU-E de células transducidas con GFP. **C.** Células CD34+ de CB y MPB fueron marcadas con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD34 y anti-CD38 humanos. Los números indican el porcentaje de células positivas de la población completa. Se muestra un experimento representativo de 3.

5 La FIG. 4 muestra la funcionalidad de CXCR4 expresado en células CD34+ transducidas. **A.** Células CD34+ de CB transducidas con CXCR4 fueron estimuladas con SDF-1 (300 ng/ml) durante los tiempos indicados y el contenido intracelular de F-actina se midió mediante FACS. Los datos indican múltiplo de incremento en el contenido de F-actina después de la estimulación con SDF-1, en comparación con células no estimuladas. Los datos representan la media \pm ET de tres experimentos independientes. **B.** Células CD34+ de CB y MPB transducidas con CXCR4 se sometieron a ensayo en un ensayo de migración Transwell en cuanto a su migración hacia diferentes concentraciones de SDF-1 según se indica. Los datos indican porcentaje de células migratorias a SDF-1. Las barras representan la media \pm ET de cinco experimentos independientes. * $p < 0,04$ (CB), * $p = 0,03$ (MPB) en comparación con células control transducidas con GFP a 125 ng/ml de SDF-1. * $p < 0,05$ (CB), * $p < 0,05$ (MPB) en comparación con células control transducidas con GFP a 10 ng/ml de SDF-1.

15 La FIG. 5 muestra la respuesta de células CD34+ de CB que sobre-expresan CXCR4 a diferentes concentraciones de SDF-1. **A.** Células CD34+ de CB transducidas de modo lentiviral se incubaron durante siete días en condiciones libres de suero con SDF-1 (50 ng/ml) en combinación con SCF (50 ng/ml), FLT-3L (50 ng/ml) e IL-6 (50 ng/ml). Los resultados se muestran como incremento múltiple en el número de células viables en comparación con las células incubadas en ausencia de SDF-1. Los resultados representan la media \pm ET de tres experimentos independientes realizados por duplicado. **B.** Células CD34+ de CB transducidas de modo lentiviral se incubaron durante la noche con 1 μ g/ml de SDF-1 y se examinaron en cuanto a (i) la expresión de CXCR4 por inmunotinción y (ii) migración in vitro inducida por SDF-1 (125 ng/ml) utilizando un sistema de migración Transwell. Las barras representan la media \pm ET de dos experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ en comparación con células no tratadas (barras negras).

25 La FIG. 6 muestra la reconstitución multilínea y la expresión de GFP de células de repoblación SCID (SRC) que sobre-expresan CXCR4. Células CD34+ de CB transducidas con CXCR4 fueron inyectadas en ratones NOD/SCID subletalmente irradiados. Cinco semanas después del trasplante los ratones fueron examinados en cuanto a la presencia de células de repoblación humanas en comparación con las células control transducidas con GFP. **A.** BM murino (i), bazo (ii) y sangre periférica (PB) (iii) se analizaron para el injerto de células humanas mediante análisis FACS que detecta % de células CD45+ humanas. Las barras representan la media \pm ET de nueve experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado. * $p < 0,005$ en comparación con células control transducidas con GFP. **B.** La diferenciación linfóide y mielóide de SRC humanas en un receptor del trasplante NOD/SCID representativo se muestra mediante tinción con anticuerpos CD19 y CD33, respectivamente. Los números indican el porcentaje de células positivas de la población viva total. **C.** Células de la BM se tñeron para el marcador pan-leucocitario CD45 específico humano y el marcador CD19 de diferenciación de linaje de células B y se analizaron mediante FACS. Los números indican el porcentaje de células CD19 calculado a partir de la población total de CD45. Los datos muestran un experimento representativo. **D.** Células de BM murinas injertadas se tñeron con anti-CD34 específico humano y mAbs anti-CD38 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los números indican el porcentaje de células CD34+/38-/low primitivas, no diferenciadas. Los datos muestran un experimento representativo. **E.** El traslado de células CD34+ inmaduras enriquecidas al bazo se determinó 16 h (MPB) o 2 h (CB) post-trasplante mediante tinción con mAbs anti-CD34 y anti-CD38 específicos. Las barras representan la media \pm ET de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$ en comparación con células control.

La FIG. 7 muestra una ilustración esquemática de CXCR4.

45 BM murina se recogió y se analizó en cuanto a la presencia de células humanas teñidas positivas para el epítipo 12G5 o 6H8 de CXCR4. Los números representan la fluorescencia media de CXCR4. **B.** Histograma representativo de análisis FACS de la fluorescencia media de CXCR4 como en A después de la tinción de células que sobre-expresan GFP (control) y CXCR4 con mAbs 12G5 y 6H8.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

50 La presente invención se refiere a células madre hematopoyéticas enriquecidas con progenitores primitivos inmaduros y que tienen una señalización mejorada de CXCR4 en respuesta a una baja y alta concentración de SDF-1, y a métodos de generar y utilizar las mismas. La presente invención se basa en resultados que demuestran que las células madre hematopoyéticas transgénicas que sobre-expresan CXCR4 exhiben niveles mejorados de población de células CD34+/CD38-/low y/o exhiben una capacidad mejorada de señalización de CXCR4 en respuesta a una baja y alta concentración de SDF-1 y exhiben un epítipo 6H8 intacto de CXCR4.

55 Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La

invención es susceptible de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras. También, se debe entender que la fraseología y terminología empleadas en esta memoria son para el propósito de descripción y no deben considerarse como limitantes.

5 El uso de la terapia celular está creciendo rápidamente, y se está convirtiendo gradualmente en una modalidad terapéutica importante en el tratamiento de diversos trastornos. El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) (p. ej., de la médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada) es un ejemplo de celular de reembolso al seguro, puesta en práctica de forma rutinaria

10 El uso de una terapia celular está creciendo rápidamente, y se está convirtiendo gradualmente en una modalidad terapéutica importante en el tratamiento de diversos trastornos. El trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) (p. ej., de la médula ósea, sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada) es un ejemplo de una terapia celular de reembolso al seguro, puesta en práctica de forma rutinaria. Sin embargo, se están desarrollando asimismo muchas otras terapias celulares, que incluyen la inmunoterapia para el cáncer y enfermedades infecciosas, la terapia de condrocitos para defectos del cartilago, la terapia de células neuronales para las enfermedades neurodegenerativas, y la terapia de células madre para numerosas aplicaciones [Forbes (2002) Clinical Science 103: 355 -369].

Uno de los problemas asociados con la terapia de células madre hematopoyéticas es la dificultad de lograr un injerto exitoso a largo plazo de las células en el tejido diana. Actualmente, los pacientes a los que se les practicó un trasplante con éxito exhiben niveles muy bajos de células madre y progenitores inmaduros, que generan células con el fenotipo deseado de exposiciones.

20 El tratamiento de células progenitoras CD34+ con citoquinas tales como HGF y MMPs ha demostrado previamente para regular positivamente la expresión de CXCR4 y exhibir una mejor respuesta a SDF-1. Sin embargo, bajo concentraciones crecientes de SDF-1, CXCR4 se internaliza y las células son menos sensibles a SDF-1. Además, el aumento de los niveles de SDF-1 induce la desensibilización y la quiescencia de la proliferación de células iniciadoras del cultivo a largo plazo (LTCIC) humanas y células madre CD34+ de hígado fetal humano primitivas, capaces de repoblación en serie de ratones NOD/SCID a los que se ha practicado un trasplante^{30,31}.

Uno de los problemas del trasplante de BM son los niveles reducidos de progenitores inmaduros de larga duración (reducción de 1 log) en la BM de pacientes a los que se les practicó un trasplante en comparación con individuos sanos⁴⁻⁷.

30 Los autores de la presente invención han encontrado que células madre hematopoyéticas transgénicas que sobre-expresan CXCR4 muestran altos niveles inesperados de la población de células CD34+/CD38-/low.

35 Los resultados obtenidos demuestran que células madre transgénicas tales como células CD34+ enriquecidas de CB y MBP son transducidas con éxito con vectores lentivirales que expresan altos niveles del transgen CXCR4. Por ejemplo, en una realización las células transducidas son 87±2,7% (CB) y 80±4% (MPB) positivas para la expresión de CXCR4 en la superficie de la célula, mientras que sólo el 28±3,1% de células CD34+ tanto de CB como MPB infectadas con el vector GFP expresaba CXCR4 endógeno.

40 Se demuestra que las células transgénicas que sobre-expresan CXCR4 no se ven afectadas en su capacidad de diferenciarse en linajes mieloide y eritroide. De acuerdo con la invención, se demuestra que las células CD34+ transducidas (tanto control como CXCR4) mostraron una diferenciación multilínea en colonias CFC GFP+ tales como unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E) y unidades formadoras de colonias gránulo-monocíticas (CFU-GM), anotadas por microscopía de contraste de fase el día 14 (figura 3A).

Inesperadamente, las células transducidas CD34+ CXCR4 de MPB demostraron un mayor porcentaje (2,9%) de población CD34+/CD38-/low en comparación con el 0,5% en las células de control. Este efecto no se observó en células CD34+ de CB (figura 3C). Por lo tanto, la transducción de CXCR4 apoya el crecimiento y/o la conservación de la población de CD34+/CD38-/low primitiva.

45 También, de forma inesperada, las células madre transducidas CXCR4 muestran un epítipo 6H8 de CXCR4 más intacto en la superficie de las células madre.

50 Células transgénicas que sobre-expresan CXCR4 exhiben una respuesta significativamente incrementada a la quimiotaxis mediada por SDF-1 de 1,5±0,04 (p < 0,001) veces para CB y 2,3±0,3 (p = 0,03) veces para MPB cuando se compara con las células transducidas con vector de control (figura 4B). Además células transgénicas que sobre-expresan CXCR4 muestran una polimerización de actina incrementada y/o una motilidad celular incrementada mediada por SDF-1. Se encontró, de acuerdo con la invención, que células CD34+ que sobre-expresan CXCR4 muestran un aumento de 3±0,11 (p < 0,001) veces de la polimerización de actina frente a un aumento de 1,5±0,07 (p = 0,002) veces en las células control, en comparación con células no estimuladas (figura 4A).

55 Por lo tanto, la sobre-expresión de CXCR4 en células progenitoras humanas resulta en una señalización inducida por SDF-1 potenciada, que conduce a un aumento de la motilidad celular y la polimerización de actina.

Células transducidas con CXCR4 demostraron un injerto incrementado de hasta $4 \pm 0,7$ ($p = 0,001$) veces para células CD34⁺ de CB cuando se compara con células control (figura 6A). Además de ello, una tinción FACS representativa con anticuerpos monoclonales CD19 y CD33 demuestra que la hematopoyesis multilineal en poblaciones linfoides y mieloides, respectivamente, se mantuvo en las células transducidas (figura 6 B) con una
 5 tendencia a una mayor linfopoyesis de células B en ratones trasplantados con células transducidas con CXCR4 (figura 6C), lo más probablemente debido a que SDF-1 es también un factor de crecimiento de células pre B. Además, se encontró que una media de $36\% \pm 19\%$ (intervalo 7,5% a 77%) de las células CD45⁺ expresaba GFP (figura 6B). La expresión del transgen también se detectó tanto en poblaciones mieloides como linfoides (figura 6B). Los ratones a los que trasplantaron células que sobre-expresan CXCR4 mostraron un aumento de cuatro veces en
 10 la población de células CD34⁺/CD38^{-low} primitivas en la BM en comparación con ratones a los que se inyectaron células transducidas con vector de control (figura 6D), lo que sugiere que los niveles más altos de injerto de células que sobre-expresan CXCR4 son debidos a la repoblación incrementada de la población de células más primitiva.

Se observó que dos horas (CB) o 16 h (MPB) post-trasplante de células transducidas con CXCR4, éstas mostraron un aumento más de dos veces en el traslado al bazo en comparación con sus homólogos de control (figura 6E). Sin embargo, no se detectaron estas diferencias en su capacidad de traslado a la BM (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las células transducidas con CXCR4 pueden trasladarse primero a corto plazo al bazo antes de la repoblación (5 semanas después del trasplante) de la BM como se sugirió previamente (Papayannopoulou T. *Curr Opin Hematol.* 2003; 10:214-219, Ref 18: Kollet O, *Blood.* 2001; 97:3283-3291).

Los presentes hallazgos permiten la generación de células madre, que pueden ser reclutados de manera eficiente a un tejido diana y repoblar el mismo, y como tal pueden ser utilizadas en numerosas aplicaciones clínicas, tales como en la reparación de lesiones del hígado y el trasplante de hígado o médula ósea.

Por lo tanto, según un aspecto, se describe un método para obtener "células iniciadoras de cultivo a largo plazo extendido" o ELTC-IC o de aumentar la población de células CD34⁺/CD38^{-low} primitiva. De acuerdo con otro aspecto, se describe un método para obtener células ELTC-IC capaces de responder a SDF-1, incluso cuando se expone a concentraciones incrementadas de SDF-1.

Tal como se utiliza en esta memoria, la frase "células madre" a células, que son capaces de diferenciarse en otros tipos de células que tienen una, función especializada particular (es decir, células "completamente diferenciadas").

Tal como se utiliza en esta memoria, una "célula transgénica" es una célula que porta un gen o segmento introducido.

Ejemplos no limitantes de células madre son células madre hematopoyéticas (HSCs) y las células madre mesenquimales (MSCs) obtenidas a partir de tejido de médula ósea de un individuo de cualquier edad o de sangre de cordón de un individuo recién nacido, células madre embrionarias (ES) obtenidas del tejido embrionario formado después de la gestación (p. ej., blastocisto), o células germinales embrionarias (EG) obtenidas a partir del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de 10 semanas de gestación.
 35 Una descripción adicional de células madre que pueden utilizarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se resume en esta memoria a continuación.

HSCs - Células madre hematopoyéticas (HSCs) son las células pluripotenciales formativas que se encuentran, entre otros, en el hígado fetal, sangre del cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica que son capaces de diferenciarse en cualquiera de los tipos específicos de células hematopoyéticas o de la sangre tales como eritrocitos, linfocitos, macrófagos y megacariocitos. Típicamente, dentro de la médula ósea, las HSCs residen en nichos que sustentan todos los factores necesarios y propiedades adhesivas para mantener su capacidad y producir una salida equilibrada apropiada de la progenie madura durante el tiempo de vida del organismo [Whetton (1999) *Trends Cell Biol* 9:233-238; Weissman (2000) *Cell* 100:157-168; Jankowska-Wieczorek (2001) *Stem Cells* 19:99-107; Chan (2001) *Br. J. Haematol.* 112:541-557].

HSCs, tal como se utilizan en esta memoria, son preferiblemente células CD34⁺, y más preferiblemente células CD34⁺/CD38^{-low}, que son una población de células madre más primitiva y son, por lo tanto, de un linaje menos restringido, y se demostró que eran las células de repoblación de la BM a largo plazo principales.

MSCs – Células madre mesenquimales son las células blásticas pluripotenciales formativas que se encuentran, entre otros, en la médula ósea, la sangre, la dermis y el periostio que son capaces de diferenciarse en más de un tipo específico de tejido mesenquimal o conjuntivo (es decir, los tejidos del cuerpo que sustentan los elementos especializados; p. ej., tejidos conjuntivos adiposo, óseo, del estroma, cartilaginoso, elástico y fibroso) dependiendo de diversas influencias de factores bioactivos tales como citoquinas.

Aproximadamente el 30% de las células de aspirado de médula humana que se adhieren a plástico se consideran MSCs. Estas células se pueden expandir in vitro y luego pueden ser inducidas a diferenciarse. El hecho de que las MSCs adultas se pueden expandir in vitro y estimular para formar hueso, cartílago, tendón, músculo o células grasas las hacen atractivas para las estrategias de ingeniería de tejidos y la terapia génica. Se han desarrollado ensayos in vivo para someter a ensayo la función de las MSC. MSCs inyectadas en la circulación pueden integrarse en un cierto número de tejidos descritos aquí anteriormente. Específicamente, el músculo esquelético y cardíaco puede ser

- 5 inducido mediante exposición a 5-azacitidina y la diferenciación neuronal de MSCs de rata y humanas en cultivo puede ser inducida mediante exposición a β -mercaptoetanol, DMSO o hidroxianisol butilado [Tomita (1999) 100:11247-11256; Woodbury (2000) J. Neurosci. Res. 61:364-370]. Además, se observa que células derivadas de MSC se integran profundamente en el cerebro después de la inyección periférica, así como después de la inyección directa de MSCs humanas en cerebro de rata; migran a lo largo de las vías utilizadas durante la migración de células madre neurales en desarrollo, son distribuidas ampliamente y comienzan a perder marcadores de la especialización de HSC [Azizi (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3908-3913]. Métodos para fomentar la proliferación de células madre mesenquimales y específicas para el linaje se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.248.587.
- 10 Los epítomos en la superficie de las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) tales como SH2, SH3 y SH4 descritos en la patente de EE.UU. N° 5.486.359 se pueden utilizar como reactivos para rastrear y capturar población de células madre mesenquimales a partir de una población celular heterogénea tal como existe, por ejemplo, en la médula ósea. Se utilizan preferiblemente células madre mesenquimales precursoras, que son positivas para CD45, de acuerdo, ya que estas células madre mesenquimales precursoras pueden diferenciarse en los diversos linajes mesenquimales.
- 15 Células madre preferidas son células madre humanas.

La Tabla 1 que figura a continuación proporciona ejemplos de células madre adultas, que pueden ser utilizados para obtener el fenotipo indicado en un tejido diana de interés.

Tabla 1

Célula madre	Fenotipo diferencial	Tejido diana	Referencia
Médula ósea	Células ovaladas, Hepatocitos	Hígado	Petersen (1999) Science 284:1168-1170
Células KTSL	Hepatocitos	Hígado	Lagasse (2000) Nat. Med. 6:1229-1234
Médula ósea	Hepatocitos	Hígado	Alison (2000) Nature 406:257; Thiese (2000) Hepatology 32:11-16
Células exocrinas pancreáticas	Hepatocitos	Hígado	Shen (2000) Nat. Cell. Biol. 2:879-887
Páncreas	Hepatocitos	Hígado	Wang (2001) Am. J. Pathol. 158:571-579
Médula ósea	Endotelio	Hígado	Gao (2001) Lancet 357:932-933
Médula ósea	Epitelio tubular, glomérulos	Riñón	Poulsom (2001) J. Pathol. 195:229-235
Médula ósea	Endotelio	Riñón	Lagaaij (2001) Lancet 357:33-37
Extra renal	Endotelio	Riñón	Williams (1969) Surg. Forum 20:293-294
Médula ósea	Miocardio	Corazón	Orlic (2001) Nature 410:701-704
Médula ósea	Cardiomiocitos y Endotelio	Corazón	Jackson (2001) J. Clin. Invest. 107:1395-1402
Médula ósea	Pneumocitos tipo 1	Pulmón	Krause (2001) Cell 105:369-377
Neuronal	Linajes hematopoyéticos múltiples	Médula	Bjornson (1999) Science 283:534-537
Médula ósea	Neuronas	SNC	Mezey (2000) Science 290:1779-1782
Médula ósea	Microglia y Astrocitos	SNC	Eglitis (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4080-4085

Abreviaturas: SP - células de población lateral; SNC - sistema nervioso central;

Como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, las células madre son transducidas con éxito con vectores lentivirales con una alta expresión del transgen CXCR4.

Los términos "polipéptido y proteína" en la presente memoria descriptiva son intercambiables.

5 La presente invención también describe muteínas de la proteína CXCR4 anterior, muteínas que conservan esencialmente la misma actividad biológica de la proteína CXCR4 que tienen esencialmente sólo las secuencias de origen natural del CXCR4. Tales "muteínas" pueden ser aquellas en las que hasta aproximadamente 20, preferiblemente no más de 10 residuos aminoácidos se pueden eliminar, añadir o sustituir por otros en la proteína CXCR4, respectivamente, de manera que modificaciones de este tipo no cambien sustancialmente la actividad biológica de la proteína muteína con respecto a la propia proteína.

10 Estas muteínas se preparan por síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o por cualquier otra técnica conocida adecuada de las mismas.

15 Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos lo suficientemente duplicativa del CXCR4 básico, de modo que tenga una actividad sustancialmente similar a la misma. Por lo tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que la proteína básica de la invención por medio de una experimentación rutinaria que comprende someter una muteína de este tipo a los tests de actividad biológica recogidos en los Ejemplos que figuran más abajo.

20 Muteínas de la proteína CXCR4 que se pueden utilizar, o ácido nucleico que codifica las mismas, incluyen un conjunto finito de secuencias que corresponden sustancialmente al CXCR4 como péptidos o polinucleótidos de sustitución que se pueden obtener rutinariamente por un experto ordinario en la técnica, sin una experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y orientaciones presentadas en esta memoria. Para una descripción detallada de la química y la estructura de proteínas, véase Schulz, G.E. et al, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, Nueva York, 1978; y Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Para una presentación de sustituciones de secuencias de nucleótidos tales como preferencias de codones, véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

30 Cambios preferidos para las muteínas son lo que se conocen como sustituciones "conservadoras". Sustituciones conservadoras de aminoácidos de los de la proteína que tiene esencialmente las secuencias de CXCR4 que se produce en la naturaleza, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo, que tienen propiedades físico-químicas suficientemente similares que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula, véase Grantham, Science, vol. 185, págs. 862-864 (1974). Está claro que las inserciones y deleciones de aminoácidos también pueden hacerse en la secuencia arriba definida sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones sólo implican unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de 50, y preferentemente menos de 20 CXCR4 y no separan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, p. ej., residuos cisteína, Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, vol. 181, págs. 223-230 (1973). También se describen muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones. Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y lo más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.

40 TABLA A

Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
45 Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
50 Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys

ES 2 534 724 T3

	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
5	Asp	Glu, Asn, Asp
	Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

10 TABLA B

Grupos más Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
15 Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
20 Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
25 His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
30 Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp
Pro	Pro
Thr	Thr
35 Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
40 Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
45 Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para obtener muteínas de la proteína para el uso descrito en esta memoria incluyen cualesquiera etapas de método conocidas tales como se presentan en las patentes de EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, expedidas a Mark et al; 5.116.943 expedida a Kohts et al., 4.965.195 expedida a Namen et al; 4.879.111 expedida a Chong et al; y 5.017.691 expedida a Lee et al; y las proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. N° 4.904.584 (Straw et al).

En otra forma de realización preferida descrita en esta memoria, cualquier muteína de la proteína CXCR4 para el uso descrito en esta memoria tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde esencialmente a la de la proteína CXCR4 indicada anteriormente. La expresión "que corresponde esencialmente a" pretende comprender muteínas con cambios menores a la secuencia de la proteína básica que no afectan a las características básicas de la misma, en particular en la medida en lo que a su capacidad para el CXCR4 se refiere. El tipo de cambios que en general se consideran incluidos dentro de la expresión "que corresponde esencialmente a" son las que podrían resultar de técnicas de mutagénesis convencionales del ADN que codifica la proteína CXCR4, dando como resultado unas pocas modificaciones menores, y el rastreo de la actividad deseada, por ejemplo aumentando la sensibilidad de las células madre a un agente quimioatrayente.

La presente invención también describe variantes de CXCR4. Una variante de CXCR4 preferida es la que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, una variante de CXCR4 más preferida es una que tiene una identidad de al menos 90% y una variante más preferida es una que tiene una identidad de al menos 95% con la secuencia de aminoácidos de CXCR4.

La expresión "identidad de la secuencia", tal como se utiliza en esta memoria, significa que las secuencias de aminoácidos se comparan mediante alineación de acuerdo con Hanks y Quinn (1991) con un refinamiento de las regiones de baja homología utilizando el programa Clustal-X, que es la interfaz de Windows para el programa de alineación de secuencia múltiple ClustalW (Thompson et al., 1994). El programa Clustal-X está disponible de Internet en <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx/>. Por supuesto, debe entenderse que si este enlace se vuelve inactivo, los expertos en la técnica podrían encontrar versiones de este programa en otros enlaces utilizando técnicas de búsqueda en internet estándares sin una experimentación excesiva. A menos que se especifique lo contrario, la versión más reciente de cualquier programa al que se aluda en esta memoria, a partir de la fecha de presentación efectiva de la presente solicitud, es la que se utiliza con el fin de poner en práctica la presente invención.

Otro método para determinar la "identidad de la secuencia" es el siguiente. Las secuencias se alinean utilizando la Versión 9 de GDAP de Genetic Computing Group (programa de alineamiento global), utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11) con una penalización de hueco abierto de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización de extensión de hueco de -4 (por cada nulo consecutivo adicional en el hueco). Después de la alineación, la identidad porcentual se calcula mediante la expresión del número de coincidencias como porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

Las muteínas descritas en esta memoria incluyen las codificadas por un ácido nucleico tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína CXCR4, que comprende esencialmente la totalidad de las secuencias que se producen en la naturaleza que codifican la CXCR4 y las secuencias que pueden diferir en su secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos derivada de forma natural en virtud de la degeneración del código genético, condiciones y que codifica una proteína CXCR4 de acuerdo con la presente invención, que comprende esencialmente la totalidad de las secuencias que se producen en la naturaleza que codifican la CXCR4 y las secuencias que pueden diferir en su secuencia de nucleótidos de la secuencia de nucleótidos derivada de forma natural en virtud de la degeneración del código genético, es decir, una secuencia de ácido nucleico algo diferente puede todavía codificar la misma secuencia de aminoácidos, debido a esta degeneración.

El término "hibridación", tal como se utiliza en esta memoria, deberá incluir cualquier proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une a la hebra complementaria a través de un apareamiento de bases (Coombs J, 1994, Dictionary of Biotechnology, Stokton Press, Nueva York NY). "Amplificación" se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y se lleva a cabo generalmente utilizando tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa bien conocidas en la técnica (Dieffenbach y Dveksler, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY).

La "rigurosidad" se produce típicamente en un intervalo de aproximadamente $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la temperatura de fusión de la sonda) a aproximadamente 20°C hasta 25°C por debajo de T_m .

La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación y de subsiguiente lavado, a las que los expertos en la técnica aluden convencionalmente como "rigurosas". Véase Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Tal como se utiliza en esta memoria, las condiciones de rigurosidad son una función de la temperatura utilizada en el experimento de hibridación, la molaridad de los cationes monovalentes y el porcentaje de formamida en la disolución

de hibridación. Para determinar el grado de rigurosidad involucrado con cualquier conjunto dado de condiciones, se utiliza primero la ecuación de Meinkoth et al. (1984) para determinar la estabilidad de los híbridos de 100% de identidad expresada como temperatura de fusión T_m del híbrido ADN-ADN:

$$T_m = 81,5 C + 16,6 C (\text{Log}M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L,$$

- 5 en que M es la molaridad de cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos G y C en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la disolución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Por cada 1 C que la T_m se reduce de la calculada para una identidad de 100% del híbrido, la cantidad de desigualdad permitida se incrementa en aproximadamente un 1%. Por lo tanto, si la T_m utilizada para cualquier experimento de hibridación dado a las concentraciones de sal y formamida especificadas es 10 C por debajo de la T_m calculada para un híbrido 100% de acuerdo con la ecuación de Meinkoth, la hibridación se producirá incluso si existe una desigualdad de hasta aproximadamente 10%.

- 10 Tal como se utiliza en esta memoria, "condiciones altamente rigurosas" son aquellos que proporcionan una T_m que no es más de 10 C por debajo de la T_m que existiría para un dúplex perfecto con la secuencia diana, ya sea calculado por la fórmula anterior o medida realmente. "Condiciones moderadamente rigurosas" son aquellas que proporcionan una T_m , que no es más de 20 C por debajo de la T_m que existiría para un dúplex perfecto con la secuencia diana, ya sea calculado por la fórmula anterior o medida realmente. Sin limitación, ejemplos de condiciones muy rigurosas (5-10 C por debajo de la T_m calculada o medida del híbrido) y moderadamente rigurosas (15-20 C por debajo de la T_m calculada o medida del híbrido) utilizan una disolución de lavado de 2 X SSC (citrate de disolución salina estándar) y 0,5% de SDS (dodecil-sulfato de sodio) a la temperatura apropiada por debajo de la T_m calculada del híbrido. La rigurosidad final de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, particularmente si las condiciones de hibridación utilizadas son aquellas que permiten que se formen híbridos menos estables junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado con mayor rigurosidad separan luego los híbridos menos estables. Una condición de hibridación común que se puede utilizar con las condiciones de lavado de altamente rigurosas a moderadamente rigurosas descritas anteriormente es la hibridación en una disolución de 6 X SSC (o 6 X SSPE (disolución salina estándar-fosfato-EDTA), 5 X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, 100 microg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado a una temperatura de aproximadamente 20 a 25 C por debajo de la T_m . Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC (Ausubel, 1987, 1999). Células madre adultas se pueden obtener utilizando un proceso quirúrgico tal como la aspiración de médula ósea, o se pueden recolectar utilizando sistemas comerciales, tales como los disponibles de Nexell Therapeutics Inc. Irvine, CA, EE.UU. Células madre utilizadas por la presente invención se recogen preferiblemente (es decir, se recolectan) utilizando un proceso de movilización de células madre, que utiliza la quimioterapia o la estimulación de citoquinas para la liberación de HSCs en la circulación de sujetos. Las células madre se recuperan preferiblemente utilizando este proceso, ya que se sabe que la movilización proporciona más HSCs y células progenitoras que la cirugía de la médula ósea.

- 35 La movilización de células madre puede ser inducida por un cierto número de moléculas. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a citoquinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL) -7, IL-3, IL-12, factor de células madre (SCF), y ligando flt-3; quimioquinas tales como IL-8, Mip-1 α , Gro β o SDF-1; y agentes quimioterapéuticos ciclofosfamida (Cy) y paclitaxel. Se apreciará que estas moléculas difieren en la cinética y eficacia, sin embargo, de acuerdo con realizaciones actualmente conocidas, G-CSF se utiliza preferiblemente solo o en combinación tal como con ciclofosfamida, para movilizar las células madre. Típicamente, G-CSF se administra diariamente a una dosis de 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 5-10 días. Métodos de movilizar células madre se describen en las Patentes de EE.UU. N $^{\circ}$ s 6.447.766 y 6.162.427. Células madre embrionarias pueden ser aisladas de blastocistos humanos. Blastocistos humanos se obtienen típicamente de embriones humanos en la preimplantación in vivo o de embriones fertilizados in vitro (FIV). Alternativamente, un embrión humano de una sola célula se puede ampliar a la fase de blastocisto. Para el aislamiento de células ES (madre embrionarias) humanas, la zona pelúcida se retira del blastocisto y la masa celular interna (ICM) se aísla por inmunocirugía, en el que las células del trofoectodermo se lisan y se separan de la ICM intacta por pipeteo suave. La ICM se extiende a continuación en un frasco de cultivo de tejido que contiene el medio adecuado, que permite su extensión. Después de 9 a 15 días, el brote derivado de la ICM se disocia en grumos, ya sea mediante una disociación mecánica o mediante degradación enzimática y las células se vuelven sembrar en un medio de cultivo de tejido reciente. Las colonias que muestran una morfología indiferenciada son seleccionadas individualmente mediante micropipeta, se disocian mecánicamente en grumos y se vuelven a sembrar. Las células ES resultantes se dividen entonces rutinariamente cada 1-2 semanas. Para más detalles sobre los métodos de preparación de células ES humanas, véase Thomson et al. [Pat. de EE.UU. N $^{\circ}$ 5.843.780; Science 282:1145,1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133,1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844,1995]; Bongso et al. [Hum Reprod 4:706, 1989]; Gardner et al., [Fertil. Steril. 69:84, 1998].

- 60 Se apreciará que también se pueden utilizar las células madre disponibles en el comercio. Células ES humanas se pueden adquirir del registro de células madre de embriones humanos NIH (<<http://escr.nih.gov>>). Ejemplos no limitantes de líneas de células madre embrionarias disponibles en el comercio son BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03 y TE32.

- 5 Células EG Humanos se pueden recuperar de las células germinales primordiales obtenidas de fetos humanos de aproximadamente 8-11 semanas de gestación utilizando técnicas de laboratorio conocidas por cualquier experto en la técnica. Las crestas genitales se disocian y se cortan en trozos pequeños, que después son disgregados en las células mediante disociación mecánica. Las células EG se cultivan en matraces de cultivo de tejidos con el medio apropiado. Las células se cultivan con una sustitución diaria de medio hasta que se observa una morfología celular compatible con células EG, típicamente después de 7-30 días o 1-4 pasajes. Para más detalles sobre los métodos para preparar células EG, véase Shamblo et al., [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726,1998] y la patente de EE.UU. N° 6.090.622.
- 10 Se apreciará que se puede efectuar preferiblemente el enriquecimiento de la población de células madre que exhibe pluripotencia. Por lo tanto, por ejemplo, como se indica antes aquí, células madre CD34+ se pueden concentrar utilizando columnas de afinidad o FACS tal como se describe adicionalmente en lo que sigue.
- El cultivo de células madre en condiciones proliferativas puede efectuarse también en los casos que los números de células madre son demasiado bajos para su uso en el tratamiento. El cultivo de células madre se describe en las patentes de EE.UU. N°s 6.511.958, 6.436.704, 6.280.718, 6.258.597, 6.184.035, 6.132.708 y 5.837.5739.
- 15 Una vez que se obtienen las células madre, éstas son transfectadas con ADN que comprende la secuencia que codifica CXCR4 o una porción activa de la misma.
- Las células "transformadas, transfectadas o transgénicas" se cultivan en condiciones adecuadas, que permiten la expresión de la proteína codificada por el polinucleótido o ADN.
- 20 Las células madre pueden ser transformadas con un ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vector de expresión de ADN cósmido que comprende la secuencia de codificación de CXCR4; sistemas de lentivirus se utilizan preferiblemente para expresar el CXCR4 o el activo que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante modificada. Un medio de este tipo incluye típicamente una disolución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados tales como vitaminas. Células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la pericia de un experto ordinario en la técnica.
- 25 En tales casos, la construcción de expresión comprende un elemento regulador que actúa en cis, activo en células de mamíferos (ejemplos anteriores), que pueden ser condiciones inducibles, específicas para el crecimiento o específicas para el tejido.
- 30 Ejemplos de promotores específicos para el tipo de células y/o específicos para el tejido incluyen promotores tales como albúmina que es específico para el hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; en particular, promotores de receptores de células T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores específicos para neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], promotores específicos para el páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos para la glándula mamaria tales como el promotor de suero lácteo (Patente de EE.UU. N° 4.873.316 y Publicación de la Solicitud de Patente Europea 264.166). La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir, además, un potenciador, que puede estar adyacente a o distante de la secuencia promotora y puede funcionar en la supra-regulación de la transcripción del mismo.
- 35 Preferiblemente, el elemento regulador que actúa en cis inducible es regulable por los cambios en el medio ambiente de las células madre durante el proceso de traslado-implantación.
- 45 La construcción de ácido nucleico puede incluir, además, un elemento IRES, preferiblemente IRES de EMCV, que puede estar entre el gen de CXCR4 y una secuencia de gen marcador o de selección y puede funcionar en la supra-regulación de la traducción del gen marcador o de selección.
- La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir, además, un elemento IRES, preferiblemente IRES de EMCV, que puede estar entre el gen de CXCR4 y una secuencia de gen marcador o de selección y puede funcionar en la supra-regulación de la traducción del gen marcador o de selección.
- 50 Una vez que se sobre-expresa CXCR4 o una porción activa de la misma, las células madre exhiben una respuesta incrementada a SDF-1.
- La identificación y el aislamiento de este tipo de células que sobre-expresan CXCR4 de acuerdo con este aspecto de la presente invención se pueden efectuar utilizando un cierto número de métodos citológicos, bioquímicos y moleculares, que son bien conocidos en la técnica.

El análisis del nivel del receptor se puede efectuar mediante citometría de flujo. Este enfoque emplea la instrumentación que escanea células individuales que fluyen por fuentes de excitación en un medio líquido. La tecnología puede proporcionar un análisis multiparamétrico rápido y cuantitativo de las células individuales vivas (o muertas) basado en la medición de la emisión de luz visible fluorescente. Este protocolo básico se centra en: medir la intensidad de fluorescencia producida por anticuerpos y ligandos marcados por fluorescencia que unen moléculas asociadas a células específicas. Para aislar poblaciones de células utilizando la fluorescencia, células madre clasificadoras de células activadas de la presente invención se ponen en contacto con anti-CXCR4 disponible comercialmente de R&D, 614 McKinley Place NE Minneapolis, MN.

Otros métodos citológicos o bioquímicos para evaluar cuantitativamente el nivel de la expresión del receptor quimiotáctico incluyen, pero no se limitan a análisis de unión utilizando una quimioquina marcada (p. ej., marcada radiactivamente), análisis de transferencia Western, biotilación en la superficie de células y la tinción de inmunofluorescencia. Se apreciará que los niveles de expresión del receptor también se pueden determinar a nivel del ARNm. Por ejemplo, ARNm de CXCR4 puede detectarse en las células mediante hibridación a una sonda específica. Tales sondas pueden ser ADN clonados o fragmentos de los mismos, ARN, hecho típicamente mediante transcripción in-vitro, o sondas de oligonucleótidos, habitualmente generadas por síntesis en fase sólida. Métodos para la generación y el uso de sondas adecuados para la hibridación específica son bien conocidos y utilizados en la técnica. La cuantificación de los niveles de ARNm se puede también efectuar utilizando una reacción de amplificación [p. ej., PCR, "PCR Protocols: A Guide To Methods And

Una diversidad de controles se puede emplear de manera útil para mejorar la precisión en ensayos de detección de ARNm. Por ejemplo, las muestras pueden hibridarse a una sonda irrelevante tratarse con ARNasa A antes de la hibridación, para evaluar una falsa hibridación.

Se pueden también utilizar ensayos funcionales para determinar la expresión del receptor quimiotáctico. Por ejemplo, un ensayo de quimiotaxis, que emplea un gradiente del agente quimiotáctico (p. ej., SDF-1) y sigue la migración celular a través de una membrana hacia el agente quimiotáctico, se puede utilizar para identificar y aislar células madre que exhiben una quimiotaxis incrementada. Si las células no expresan niveles suficientes del receptor quimiotáctico (p. ej., CXCR4), entonces la mayoría de las células permanecerá en la membrana. Sin embargo, tras la expresión incrementada del receptor quimio-atrayente de la presente invención, las células migrarán a través de la membrana y se asentarán en el fondo del pocillo de la placa de quimiotaxis (véase el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos) Se apreciará que un ensayo de traslado funcional puede también ser utilizado por el método de la presente invención. Un ensayo de este tipo se describe en Kollet (2001) Blood 97:3283-3291.

Células madre que exhiben una capacidad de señalización de CXCR4 incrementada en respuesta a bajas o altas concentraciones de SDF-1 y/o células madre que exhiben niveles incrementados de progenitores primitivos inmaduros tal como una población de CD34+/CD38-/low, se pueden utilizar en una amplia gama de aplicaciones clínicas.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se describe un método para tratar un trastorno que requiere el reemplazo de células o tejido. El método se efectúa al proporcionar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre transgénicas que sobre-expresan CXCR4 o una porción activa del mismo y al proporcionar de este modo niveles crecientes de progenitores primitivos inmaduros tales como una población de CD34+/CD38-/low con una mejor respuesta a SDF-1, incluso en un entorno con concentraciones incrementadas de SDF-1, para tratar con ello el trastorno que requiere el reemplazo de la célula o tejido en el sujeto. Trastornos que requieren el reemplazo de células o tejidos incluyen, pero no se limitan a diversas inmunodeficiencias tal como en linfocitos T y/o B, o trastornos inmunes tales como artritis reumatoide. Inmunodeficiencias de este tipo pueden ser el resultado de infecciones virales, HTLV1, HTLV7, HTLV8, exposición grave a radiación, terapia del cáncer o el resultado de otro tratamiento médico; deficiencias hematológicas incluyen, pero no se limitan a leucemias, tales como la leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia no linfoblástica aguda (ANLL), leucemia mielocítica aguda (AML) o leucemia mielocítica crónica (CML). Otras deficiencias hematológicas de este tipo pueden ser, pero no se limitan a síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) [tales como, por ejemplo, deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) y SCID ligada a X (XSCID)], osteopetrosis, anemia aplásica, enfermedad de Gaucher, talasemia y otras anomalías hematopoyéticas congénitas o genéticamente determinadas; otros trastornos que requieren el reemplazo de células o tejidos incluyen los asociados con insuficiencia hepática, insuficiencia pancreática, trastornos neurológicos, los trastornos que requieren la formación ósea aumentada tales como osteoartritis, osteoporosis, afecciones traumáticas o patológicas que implican cualquiera de los tejidos conjuntivos tales como defectos de los huesos, defectos del tejido conjuntivo, defectos del esqueleto o defectos de cartílagos.

Sujetos individuales preferidos de acuerdo con la presente invención son mamíferos tales como caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos, bovinos, y preferiblemente seres humanos.

Las células madre de acuerdo con este aspecto de la presente invención se obtienen preferiblemente a partir del sujeto a ser tratado. Sin embargo las células madre también se pueden obtener a partir de un donante singénico, alogénico y, menos preferiblemente, de un donante xenogénico.

Se apreciará que cuando se utilizan células madre alogénicas o xenogénicas, el sujeto receptor y/o las células se tratan preferiblemente para prevenir rechazos de injerto frente a huésped y huésped frente a injerto. Protocolos de inmunosupresión son bien conocidos en la técnica y algunos se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.447.765.

5 Se apreciará que las células madre descritas en esta memoria se pueden modificar genéticamente para expresar cualquier gen terapéutico tal como un agente antiviral contra la hepatitis, descrito adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 5.928.638. Las células madre se trasplantan en el sujeto receptor. Esto se efectúa generalmente utilizando métodos bien conocidos en la técnica, y habitualmente implica la inyección o la introducción de las células madre tratadas en el sujeto utilizando herramientas clínicas bien conocidas por los expertos en la técnica (patentes de EE.UU. N° 6.447.765, 6.383.481, 6.143.292 y 6.326.198).

10 Por ejemplo, la introducción de las células madre puede efectuarse local o sistemáticamente a través de la administración intravascular, tal como la administración intravenosa o intraarterial, la administración intraperitoneal, y similares. Las células pueden ser inyectadas en una bolsa de infusión Fenwall de 50 ml utilizando jeringas estériles u otros mecanismos de transferencia estériles. Las células pueden entonces ser infundidas inmediatamente en el paciente a través de la administración IV a lo largo de un período de tiempo, tal como 15 minutos, en un conducto de flujo IV libre. En algunas realizaciones, se pueden añadir también reactivos adicionales tales como tampones o sales. La composición para la administración debe formularse, producirse y almacenarse de acuerdo con métodos estándares que cumplan con la esterilidad y estabilidad adecuadas.

20 Dosis de células madre se pueden determinar de acuerdo con el uso prescrito. En general, en el caso de la administración parenteral, es habitual administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del receptor. El número de células utilizadas dependerá del peso y estado del receptor, del número o frecuencia de administración y otras variables conocidas por los expertos en la técnica.

25 Una expansión adicional de un sistema que sobre-expresa CXCR4 puede servir como una herramienta eficaz para mejorar el traslado comprometido y el injerto tras protocolos^{8,9} de terapia génica. Además, la sobreexpresión de CXCR4 en células CD34+ humanas puede facilitar el trasplante clínico mejorado de CD34+ en CB, así como el trasplante autólogo movilizado de CD34+ en PBL después del tratamiento de quimioterapia, los cuales pueden ser limitados debido al bajo rendimiento celular⁶. Además, otros tipos de células tales como células madre mesenquimales poseen la capacidad de migrar a diversos órganos, sin embargo sus niveles de injerto son particularmente bajos. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema que facilita la expresión constitutiva o transitoria de CXCR4 en la superficie celular junto con la inducción de la expresión o la administración de SDF-1 en el órgano diana podría ser beneficiosa para la migración direccional in vivo, así como la repoblación a largo plazo y el desarrollo de diversos tipos de células en el órgano de interés en los pacientes, como parte de la reparación de órganos. Por lo tanto, los autores de la invención sugieren la sobreexpresión de CXCR4 como un sistema universal para la regulación de la función y el desarrollo de células madre, lo que podría mejorar el resultado de muchos protocolos clínicos.

35 Después de la administración de las células al sujeto, se puede evaluar, si se desea, el efecto del tratamiento tal como se conoce en la técnica. El tratamiento se puede repetir según sea necesario o requerido.

40 Objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se esbozan anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones que figura más adelante encuentra un soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

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

45 En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procesos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R.M., comp. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al. "ADN recombinante", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (comps.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se recogen en las patentes de EE.UU. N°s 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J.E., comp. (1994), "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., comp. (1994); Stites et al. (comps.), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (comps.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533;

3.996.345; 4.034.074; J., comp. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., y Higgins, S.J. comps. (1985) "Transcription and Translation" Hames, B.D., y Higgins, S.J., Comps. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., comp. (1986), "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986), "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al, "Strategies for Protein Purification and Characterization -A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se piensa que los procesos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

EJEMPLO 1:

10 **Células CD34⁺ humanas transducidas con CXCR4 tienen una expresión de CXCR4 en superficie incrementada.**

CXCR4 se sobre-expresó en células CD34⁺ enriquecidas de CB y MPB humanas utilizando un sistema de transferencia génica lentiviral derivado del VIH. Se analizaron las células transducidas en cuanto a la expresión en la superficie de CXCR4.

15 **Materiales y Procesos Experimentales**

Células humanas - Se obtuvieron células de la sangre de cordón umbilical (CB) y células de la sangre periférica movilizada (MPB) de adultos después de consentimiento informado. El enriquecimiento de células CD34⁺ se efectuó utilizando la separación de perlas magnéticas según se describió anteriormente [Kollet (2001) Blood 97:3283-3291]. La expresión de CXCR4 se determinó por citometría de flujo utilizando anti CXCR4 humano purificado (clon 12G5, R&D, Minneapolis, MN) y fragmento F(ab')₂ secundario de IgG anti ratón de cabra - FITC (Jackson, West Grove, PA).

Construcción y producción del vector viral - El vector de expresión lentiviral del gen CXCR4 humano se construyó mediante el aislamiento de un ADNc de CXCR4 de 1,2 kb a partir de células de CB humana y el enlace al gen de proteína fluorescente verde (GFP) potenciado a través de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). El fragmento que contiene CXCR4-IRES-GFP se ligó con el promotor de EF-1 α para generar un vector auto-inactivante (SIN), en que el fragmento que contiene la casete bicistrónica EF-1 α -CXCR4-IRES-GFP se insertó en una cadena principal del vector pHR'-SIN (Woods et al. Blood. 2000 1 de diciembre; 96(12):3725-33.) proporcionado amablemente por el Dr. Didier Trono, Ginebra, Suiza. El vector de control carece del gen CXCR4 y sólo expresa GFP (fig. 1).

El vector lentiviral derivado del VIH, auto-inactivante y de replicación defectuosa se generó mediante transfección transitoria de la línea celular de empaquetamiento 293T por medio de un reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania), utilizando un sistema de tres plásmidos: vector de transferencia pHR'-EF1 α -GFP-SIN (vector control) o pHR'-EF1 α -CXCR4-IRES-GFP-SIN para células CD34⁺ o pHR'-CMV-GFP (vector control) o pHR'-CMV-CXCR4-IRES-GFP (vector experimental) para hMSCs, el plásmido codificador de la envoltura pMD.G y la construcción de empaquetamiento pCMVR8.91 (Zufferey R, *Nat. Biotechnol.* 1997; 15:871-875 Naldini L, *Science.* 1996; 272:263-267). Veinticuatro horas después de la transfección, el sobrenadante viral fue reemplazado por medio libre de suero suplementado con BSA al 2% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 10 mg/ml de insulina (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), 200 mg/ml de transferrina (Sigma), 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM (Biological Industries), 100 mg/ml de estreptomycin (Biological Industries), y Hepes 10 mM (Biological Industries). Veinticuatro horas más tarde, se recogió el sobrenadante viral, se filtró (filtro Minisart de 0,45 μ m, Sartorius AG, Alemania), y se utilizó para la transducción de células diana.

Transducción de células CD34⁺ - La transducción de células CD34⁺ se realizó utilizando un protocolo de doble transducción en HSC⁵⁰. Células CD34⁺ (hasta 4x10⁵ por pocillo) fueron pre-estimuladas con SCF (50 ng/ml) en 400 μ l de medio libre de suero durante 24 horas en una placa de 12 pocillos. Sobrenadante viral (1,6 ml/35 mm pocillo) suplementado con SCF (50 ng/ml), FLT-3L (50 ng/ml), ambos de R&D Systems (Minneapolis, MN), e IL-6 (50 ng/ml; Interpharm Laboratories, Ares-Serono Group, Ness Ziona, Israel) se añadió a las células con una carga viral tan elevada como 2x10⁷ TU/ml (primera infección). La transducción se repitió 24 horas más tarde (segunda infección). La eficacia de infección se determinó de acuerdo con la expresión celular de CXCR4 utilizando CXCR4-PE antihumano específico (12G5, BD Pharmingen, San Diego, CA) y GFP (canal FL1) mediante análisis de citometría de flujo (Kollet 2002 blood vol 100 página 2778) (FACSCalibur, Becton Dickinson (BD), San Jose, CA) 72 horas después de la transducción. Células simuladas se cultivaron en las mismas condiciones que las células transducidas, sin exposición a vectores lentivirales.

Se encontró que las células CD34⁺ tanto de CB como de MPB mostraron eficacias altas de transducción según se puntúa por citometría de flujo, alcanzando un 70% de células GFP positivas en células transducidas con el vector GFP (control) y un 50% en células transducidas con CXCR4 (figura 2A-panel superior). Además, las células CD34⁺ infectadas con CXCR4 eran 87 \pm 2,7% (CB) y 80 \pm 4% (MPB) positivas para la expresión de CXCR4 en la superficie de la célula, mientras que sólo el 28 \pm 3,1% células CD34⁺ de CB y MPB infectadas con el vector GFP expresaban CXCR4 endógeno, asemejándose a los niveles de células no transducidas (células simuladas) (figura 2A-panel

inferior (representativo) y B). Curiosamente, las células transducidas con CXCR4 mostraron una mayor intensidad de fluorescencia media (MFI) de 89,4 frente a 10,2 de las células transducidas con vector GFP (figura 2C). Sin embargo, su expresión intracelular de CXCR4 fue inferior a sus homólogos control (GFP) (figura 2C). De manera notable, las células transducidas con el vector de CXCR4 tenían menos células GFP⁺, en consonancia con los informes anteriores que muestran niveles de expresión reducidos de genes que se colocan aguas abajo de un IRES⁵¹.

Estos resultados demuestran que las células CD34⁺ tanto de CB como de MPB pueden ser transducidas con éxito con los vectores lentivirales con una elevada expresión del transgen CXCR4.

EJEMPLO 2:

10 **Células CD34⁺ humanas que sobre-expresan CXCR4 mantienen su potencial de diferenciación in vitro y la expresión del transgen.**

Células madre y progenitoras son capaces in vitro de diferenciación multilineaje en linajes tanto mieloides como eritroides cuando se proveen del cóctel de citoquinas apropiado (Metcalf & Manley, recent results in cancer research 1977 vol 61 página 1). Por lo tanto, los autores de la invención evaluaron el efecto de la expresión del transgen sobre la capacidad de células transducidas de diferenciarse in vitro, en los linajes diferenciados.

Procesos experimentales

Ensayo de CFU – Con el fin de detectar los niveles de progenitores humanos, así como el mantenimiento de la expresión del transgen después de la transducción en cultivos ex vivo, se realizaron cultivos semisólidos según se describe previamente⁵². En síntesis, células CD34⁺ de CB transducidas (3×10^3 células/ml) se sembraron en metilcelulosa al 0,9% (Sigma), FCS al 30%, 2ME 5×10^{-5} M, 50 ng/ml de SCF, 5 ng/ml de IL-3, 5 ng/ml de GM-CSF (R&D) y 2 u/ml de eritropoyetina (Orto Bio Tech, Don Mills, Canadá). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y se puntuaron 14 días más tarde mediante microscopía de contraste de fase para GFP⁺, así como colonias mieloides o eritroides mediante criterios morfológicos.

Se encontró que la expresión del transgen no afectaba a la capacidad de las células de diferenciarse hacia los linajes mieloides y eritroides. Células CD34⁺ transducidas (tanto control como CXCR4) mostraron una diferenciación multilineaje en colonias de CFC GFP⁺ tales como unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E) y unidades formadoras de colonias gránulo-monocíticas (CFU-GM), puntuado por microscopía de contraste de fase el día 14 (figura 3A). El número de colonias de CFC GFP⁺ transducidas con el vector control era 2 veces mayor que las colonias de CFC GFP⁺ transducidas con el vector de CXCR4, de conformidad con el menor porcentaje de células GFP⁺ después de la transducción con este vector (figura 3B). Curiosamente, mientras que tanto las células control como las células transducidas con CXCR4 producían el mismo número de colonias de CFU-GM, existía una reducción del 25% ($p = 0,004$) en las colonias de BFU-E producidas a partir de células transducidas con CXCR4 (figura 3B), lo que confirma los hallazgos previos de Gibellini et al que demuestran que las interacciones SDF-1/CXCR4 suprimen la diferenciación del linaje eritroide⁵³. Además, células CD34⁺ de MPB transducidas con CXCR4 demostraron un mayor porcentaje (2,9%) de la población CD34⁺/CD38⁻/low en comparación con el 0,5% en las células de control. Este efecto no se observó en células CD34⁺ de CB (figura 3C). Por lo tanto, la transducción con CXCR4 puede preservar y/o ampliar mejor la población CD34⁺/CD38⁻/low primitiva

EJEMPLO 3:

CXCR4 expresada en células CD34⁺ transducidas es funcional.

Las quimioquinas inducen la motilidad celular mediante la activación de una cascada de eventos intracelulares que conducen a las disposiciones del citoesqueleto de actina y, en particular, a la polimerización⁵⁴. Como un medio para determinar la funcionalidad del receptor insertado, los autores de la invención examinaron el efecto de la sobre-expresión de CXCR4 sobre la activación inducida por SDF-1 de la maquinaria de la motilidad.

Procesos experimentales

Ensayo de polimerización de actina - Células transducidas fueron estimuladas con SDF-1 α (300 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ) en RPMI libre de suero a 37°C durante los tiempos indicados. La reacción se detuvo mediante la adición de 3 volúmenes de paraformaldehído al 3,7% a TA (temperatura ambiente) durante 10 min, seguido de lavado con PBS y permeabilización en hielo durante 2 min con Triton-Hepes al 0,1% (Hepes 20 mM, sacarosa 300 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, Triton al 0,1%). Las células fueron entonces teñidas con FITC-faloidina (2 mg/ml, Sigma) durante 30 min a TA, se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo.

Ensayo de migración – RPMI (600 μ l) suplementado con FCS al 10% que contiene 125 ng/ml de SDF-1 α se añadió a la cámara inferior de un transwell de 24 pocillos de Costar (Corning (tamaño de poro 5 μ m), NY). 1×10^5 células CD34⁺ transducidas en 100 μ l de medio se cargaron a la cámara superior y se les permitió migrar durante 4 horas a 37°C. Las células migratorias se recogieron de la cámara inferior y se recontaron durante 30 segundos utilizando un dispositivo FACSCalibur. El control de la migración espontánea se realizó sin SDF-1 α en la cámara inferior.

Los autores de la invención encontraron que células CD34⁺ de CB exhibían un pico de la polimerización de actina después de la estimulación durante 30 s con SDF-1 (figura 4A). En este instante, las células que sobre-expresan CXCR4 demostraron un incremento de $3\pm 0,11$ ($p < 0,001$) veces de la polimerización de actina frente a un incremento de $1,5\pm 0,07$ ($p = 0,002$) veces en células de control cuando se compara con células no estimuladas (figura 4A). A la vista de estos resultados, los autores de la invención investigaron el potencial de migración de células CD34⁺ de CB y MPB transducidas con CXCR4 a un gradiente de SDF-1 (125 ng/ml) en un ensayo de migración transwell. Las células que sobre-expresan CXCR4 demostraron una respuesta significativamente incrementada a la quimiotaxis mediada por SDF-1 de $1,5\pm 0,04$ ($p < 0,001$) veces para CB y de $2,3\pm 0,3$ ($p = 0,03$) veces para MPB cuando se compara con células transducidas con vector de control (figura 4B). En conjunto, estos datos sugieren que la sobre-expresión de CXCR4 en células progenitoras CD34⁺ enriquecidas humanas resulta en una señalización inducida por SDF-1 potenciada, lo que conduce a un incremento en la motilidad celular.

EJEMPLO 4:

Células CD34⁺ transducidas con CXCR4 son más sensibles a las bajas concentraciones de SDF-1.

Se estableció la hipótesis de que la sobre-expresión de CXCR4 en células CD34⁺ puede hacerlas más sensibles a las bajas concentraciones de SDF-1. Con el fin de demostrar esto, se llevó a cabo una migración in vitro de las células transducidas a diferentes concentraciones de SDF-1. Además de ello, bajas concentraciones de la quimioquina SDF-1 en sinergia con citoquinas han demostrado potenciar la proliferación de células CD34⁺ humanas, así como la supervivencia, tanto humana como murina, de células progenitoras²⁵⁻²⁸. Por lo tanto, se vigiló el efecto de SDF-1 a bajas concentraciones sobre la proliferación de células que sobre-expresan CXCR4.

Procesos experimentales

Ensayo de la migración – Como se ha descrito previamente (12). En síntesis, RPMI (600 μ l) suplementado con FCS al 10% que contiene 10 ng/ml o 125 ng/ml de SDF-1 α se añadió a la cámara inferior de un transwell de 24 pocillos de Costar (Corning (tamaño de poro 5 μ m), NY). 1×10^5 células CD34⁺ transducidas en 100 μ l de medio se cargaron a la cámara superior y se les permitió migrar durante 4 horas a 37°C. Las células migratorias se recogieron de la cámara inferior y se recontaron durante 30 segundos utilizando un dispositivo FACSCalibur. El control de la migración espontánea se realizó sin SDF-1 α en la cámara inferior.

Ensayo de proliferación – Siguiendo un protocolo de transducción de 96 horas, células CD34⁺ de CB se cultivaron durante 7 días en duplicados en medio libre de suero suplementado con SCF 50 ng/ml, FLT-3L 50 ng/ml e IL-6 50 ng/ml en presencia o ausencia de SDF-1 50 ng/ml. Las células se contaron diariamente y la viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de tripano.

Se encontró que ya a bajas concentraciones de SDF-1 (10 ng/ml), la migración de células transducidas con CXCR4 de CB había alcanzado niveles pico de 25%, similares a la migración de estas células a una concentración alta de SDF-1 (125 ng/ml). Como se muestra en la figura 4B, a bajas concentraciones de SDF-1 (10 ng/ml) células infectadas con CXCR4, aisladas de CB humana, mostraron un incremento de hasta 2,5 veces ($p < 0,05$) de la migración en comparación con sus homólogos transducidos con vector de control, mientras que a mayores concentraciones de SDF-1 (125 ng/ml) este aumento era menos significativo (1,5 veces). De manera similar, a pesar de que el porcentaje de células migratorias era mucho menor que para células CD34⁺ de CB, células CD34⁺ de MPB transducidas con CXCR4 mostraron un incremento de 2,6 ($p = 0,05$) veces en la migración a 10 ng/ml de SDF-1 en comparación con un incremento de 2 veces a 125 ng/ml de SDF-1 (figura 4B). Además de ello, en la evaluación de la proliferación de células que sobre-expresan CXCR4 a lo largo de un período de siete días, se observó que las células CD34⁺ de CB transducidas con CXCR4 habían casi duplicado su cantidad sembrada ($p < 0,05$) ya 48 horas después de la siembra, y este efecto podía observarse hasta durante siete días ($p = 0,001$) en cultivo. Las células de control, sin embargo, sólo incrementaron su número de células el día cinco hasta sólo $1,2\pm 0,05$ veces, y el día 7 su número se había reducido a menos de la cantidad original sembrada (figura 5A). De manera notable, este efecto proliferativo potenciado de células que sobre-expresan CXCR4 no se detectó a concentraciones mayores (100 ng/ml) de SDF-1 (datos no mostrados). Momentos más largos en cultivo condujeron a la diferenciación celular, descartando la posibilidad de la transformación celular después de la transducción lentiviral. Tomados en conjunto, los resultados de los autores de la invención indican que la sobre-expresión de CXCR4 en células CD34⁺ potencia su respuesta a bajas concentraciones de SDF-1, incrementando tanto su motilidad como proliferación/supervivencia, con una respuesta menor a altas concentraciones en comparación con células de control.

EJEMPLO 5:

Células que sobre-expresan CXCR4 son menos sensibles a la desensibilización inducida por SDF-1.

Se ha documentado que SDF-1 a concentraciones altas (1 μ g/ml y superiores) induce la desensibilización e internalización, a través de la endocitosis, de la molécula de CXCR4 en la superficie de la célula, la cual puede finalmente ser reciclada a la superficie de la célula⁵⁵. Por lo tanto, los autores de la invención han sometido a ensayo el efecto de altas concentraciones de SDF-1 sobre las células que sobre-expresan CXCR4.

Procesos experimentales

Expresión de CXCR4 en superficie de células - Células CD34⁺ transducidas con CXCR4 se incubaron durante una noche con 1 µg/ml de SDF-1. La expresión de CXCR4 en la superficie de las células se determinó marcando las células con CXCR4-PE antihumano (12G5, BD Pharmingen, San Diego, CA) y se analizó mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson (BD), San Jose, CA).

Ensayo de la migración -RPMI (600 µl) suplementado con FCS al 10% que contiene 125 ng/ml de SDF-1α se añadió a la cámara inferior de un transwell de 24 pocillos de Costar (Corning (tamaño de poro 5 µm), NY). 1x10⁵ células CD34⁺ transducidas en 100 µl de medio se cargaron a la cámara superior y se les permitió migrar durante 4 horas a 37°C. Las células migratorias se recogieron de la cámara inferior y se recontaron durante 30 segundos utilizando un dispositivo FACSCalibur. El control de la migración espontánea se realizó sin SDF-1α en la cámara inferior.

Células CD34⁺ de CB transducidas con CXCR4 se incubaron durante una noche con 1 µg/ml de SDF-1 y se analizaron en cuanto a la expresión de CXCR4 en la superficie celular. Inesperadamente, sólo había una disminución del 40% (p < 0,05) en la expresión del receptor de la superficie celular en células que sobre-expresan CXCR4, mientras que en las células de control existía una internalización del receptor de hasta el 90% (p < 0,05) la (figura 5Bi). Después de esta desensibilización, las células también se sometieron a ensayo in vitro en cuanto a la migración direccional hacia un gradiente de SDF-1 (125 ng/ml). Las células de control mostraron una disminución significativa (p < 0,05) en la migración mediada por SDF-1, mientras que la migración de células transducidas con CXCR4 apenas se vio afectada (figura 5Bii). Esto sugiere que la internalización de CXCR4 se compensa por la sobre-expresión constante del receptor, que continuamente sigue siendo funcional.

EJEMPLO 6:**Sobre-expresión de CXCR4 mejora el injerto de SRC de ratones NOD/SCID.**

Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de CXCR4 en el injerto dependiente de SDF-1/CXCR4 de células CD34⁺ de CB humanas, células progenitoras transducidas se trasplantaron en ratones NOD/SCID.

Procesos experimentales

Ratones. Ratones NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID) se criaron y mantuvieron como se ha descrito previamente¹⁸. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales, del Instituto Weizmann. Ratones de ocho - diez semanas de edad fueron irradiados subletalmente (375 cGy, de una fuente de 60Co) y trasplantados con células humanas según se indica [2x10⁵ células/ratón (injerto) y 5x10⁵ células/ratón (traslado)] 24 horas después de la irradiación.

Injerto de células humanas y traslado - Los ratones fueron sacrificados alrededor de cinco semanas después del trasplante y se recogieron células de la médula ósea y del bazo y se volvieron a suspender en una suspensión de células individuales. El injerto de células humanas se ensayó mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD) utilizando mAb D45-APC antihumano específico (BD Pharmingen). El análisis del linaje se realizó mediante tinción con anti-CD19-PE (BD Pharmingen) o anti-CD33-PE (BD). La población de células más primitivas se analizó utilizando mAb CD34-APC (BD Pharmingen) junto con anti-CD38-PE (BD). También se analizaron las células humanas en cuanto a la expresión de GFP (canal FL1). Se utilizaron plasma humano e IgG de ratón para bloquear los receptores Fc. Anticuerpos de control de isotipo y células obtenidas de ratones no sometidos a trasplante se utilizaron como controles negativos y células CD34⁺ de CB humanas se utilizaron como controles positivos.

Los autores de la invención encontraron que las células transducidas con CXCR4 demostraron un injerto incrementado de células humanas en la BM murina de hasta 4±0.7 (p = 0,001) veces para las células CD34⁺ de CB en comparación con las células control (figura 6Ai). De manera similar, las células transducidas con CXCR4 mostraron un incremento de 2,7±0,8 (p = 0,05) veces en la repoblación del bazo (figura 6Aii). Curiosamente, no se observaron diferencias significativas en los números de células circulantes humanas en ratones trasplantados con células control o transducidas con CXCR4 (figura 6Aiii). Además de ello, un FACS representativo de la tinción con anticuerpos monoclonales CD19 y CD33 demuestra que la hematopoyesis multilinaje en poblaciones linfoides y mieloides, respectivamente, se mantuvo en la BM murina (figura 6B) con una tendencia a más linfopoyesis de células B en ratones trasplantados con células transducidas con CXCR4 (figura 6C), lo más probablemente dado que SDF-1 es también un factor de crecimiento de células pre B. Además de ello, se encontró que una media de 36%±19% (intervalo 7,5% a 77%) de las células CD45⁺ expresa GFP (figura 6B). La expresión del transgen también se detectó en poblaciones tanto mieloides como linfoides (figura 6B). Los ratones trasplantados con células que sobre-expresan CXCR4 mostraron un incremento de cuatro veces la población primitiva de células CD34⁺/CD38^{-low} en comparación con los ratones a los que se inyectaron células transducidas con vector de control (figura 6D), lo que sugiere que los niveles más altos de injerto de células que sobre-expresan CXCR4 se deben a la repoblación incrementada de la población celular más primitiva.

Se ha demostrado previamente que el traslado de células CD34+38-/lowCXCR4 humanas inmaduras a la BM murina y el bazo depende de interacciones CXCR4/SDF-1¹⁸. Por lo tanto, se examinó adicionalmente si la sobre-expresión

de CXCR4 en células CD34+ humanas podría mejorar su sobre-expresión a la BM y el bazo de ratones NOD/SCID subletalmente irradiados. Se observó que dos horas (CB) o 16 h (MPB) post-trasplante células transducidas con CXCR4 de trasplante mostraban un incremento de más de dos veces en el traslado al bazo en comparación con sus homólogos de control (figura 6E). Sin embargo, no se detectaron estas diferencias en su capacidad de traslado a la BM (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que células transducidas con CXCR4 pueden primero trasladarse al dominio extracelular de CXCR4 (figura 7), ya sea para controlar células CD34+ de la sangre del cordón transducidas con GFP o células CD34+ que sobre-expresan CXCR4. Los autores de la invención encontraron que células CD34+ de la CB transducidas con GFP (control), que expresan sólo CXCR4 endógena, no podían unir el mAb 6H8, a pesar de la unión del mAb 12G5 (no mostrado), que se une al segundo dominio extracelular de CXCR4 humana, mientras que células CD34+ de CB que sobre-expresan CXCR4 teñían de forma positiva para los dos anticuerpos 12G5 y 6H8. Estos datos sugieren que la sobre-expresión de CXCR4 previene parcialmente el deterioro o la escisión del epítipo 6H8, que se ha demostrado que desempeña un papel en la función quimiotáctica de CXCR4 (Brelot et al, J Biol. Chem. 275:23736-23744).

En un segundo conjunto de experimentos, los autores de la invención siguieron la unión de los mAbs 6H8 y 12G5 a células humanas aisladas de la BM de ratones NOD/SCID trasplantados con células control o células CD34* de CB que sobre-expresan CXCR4 (Figura 8). Encontraron que células humanas aisladas de la BM murina quimérica, que alberga células que sobre-expresan CXCR4 humanas, mostraron un mayor porcentaje de células positivas tanto para 6H8 como para 12G5 que en células de control humanas que albergan BM murina quimérica. Además de ello, mientras que las células que portan GFP de control mostraron un claro deterioro del epítipo 6H8, no hubo deterioro alguno de GFP en células que sobre-expresan CXCR4 portadoras de GFP, lo que indica que también existe un menor deterioro in vivo del epítipo 6H8 en las células que sobre-expresan.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe interpretarse como una admisión de que una referencia de este tipo esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

REFERENCIAS

1. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35
2. Abkowitz J, Robinson A, Kale S, Long M, Chen J. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood.* 2003
3. Wright DE, Wagers AJ, Pathak Gulati A, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001;294:1933-1936
4. Selleri C, Maciejewski J, De Rosa G, Raiola A, Risitano A, Picardi M, Pezzullo L, Luciano L, Ricci P, Varriale G, Della Cioppa P, Del Vecchio L, Rotoli B. Long-lasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1029-1037
5. Podesta M. Transplantation hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:331-336.
6. Podesta M, Piaggio G, Frassoni F, Pitto A, Mordini N, Bregante S, Valeriani A, Bacigalupo A. Deficient reconstitution of early progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1011-1017
7. Carton G, Herault O, Benboubker L, Clement N, Bernard M, Roingeard F, Desbois I, Colombat P, Binet C, Domenech J. Quantitative and qualitative analysis of the human primitive progenitor cell compartment after autologous stem cell transplantation. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 2002;11:359-368
8. Hall K, Abonour R, Cornetta K, EF S. Decreased homing of transduced human bone marrow CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003;abst. 100
9. Kang E, Hanazano Y, Frare P, Vanin E, De Witte M, Metzger M, Liu J, Tisdale J. Persistent low-level engraftment of rhesus peripheral blood progenitor cells transduced with the fanconi anemia C gene after conditioning with low-dose irradiation. *Mol Ther.* 2001;3:911-919
10. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996;382:635-638
11. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9448-9453
12. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Herschkoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood.* 2001;97:3283-3291
13. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999;283:845-848
14. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman R, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *JCI.* 2000;106:1331-1339
15. Kollet O, Petit I, Kahn J, Samira S, Dar A, Peled A, Deutsch V, Gunetti M, Piacibello W, Nagler A, Lapidot T. Human CD34+CXCR4- sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood.* 2002;100
16. Spencer A, Jackson J, Baulch-Brown C. Enumeration of bone marrow 'homing' haemopoietic stem cells from G-CSF-mobilised normal donors and influence on engraftment following allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:1019-1022.
17. Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S, van der Lelie H, van der Schoot CE, Gerritsen WR. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97:799-804
18. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia.* 2002;16:1992-2003
19. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol.* 1998;160:1522-1531
20. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel

- M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112:160-169
21. Rusten L, Cue L, Pharo A, Jacobsen S, Lapidot T, Kvalheim G. TNF- α and TGF- β potentially upregulate the expression of CXCR4 on peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 2000;94:252a
22. Denning-Kendall P, Singha S, Bradley B, Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood Cd34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells.* 2003;21:61-70
23. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5320-5325
24. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med.* 2002;195:1145-1154
25. Grafte-Faure S, Levesque C, Ketata E, Jean P, Vasse M, Soria C, Vannier JP. Recruitment of primitive peripheral blood cells: synergism of interleukin 12 with interleukin 6 and stromal cell-derived FACTOR-1. *Cytokine.* 2000;12:1-7
26. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, H. KC. Enhanced myelopoiesis in sdf-1-transgenic mice: sdf-1 modulates myelopoiesis by regulating progenitor cell survival and inhibitory effects of myelosuppressive chemokines [abstract]. *Blood.* 1999;94:650a
27. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le Bousse-Kerdiles MC. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000;95:756-768
28. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood.* 2002;99:1117-1129.
29. Broxmeyer H, Kohli L, Kim C, Lee Y, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Shaheen M, Li X, Clapp D. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G α i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73:630-638
30. Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice. *Blood.* 2002;99:792-799.
31. Cashman J, Dykstra B, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Changes in the proliferative activity of human hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice and enhancement of their transplantability after in vivo treatment with cell cycle inhibitors. *J. Exp. Med.* 2002;196:1141-1149
32. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.* 1999;10:463-471
33. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, Katsura Y, Kishimoto T, Nagasawa T. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:5663-5667
34. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Mugurumu Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood.* 2003;101:2905-2913
35. Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y, Fujimura Y, Tsuji T, Ikehara S, Sonoda Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood.* 2003;101:2924-2931
36. Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT. CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 2001;166:5027-5033
37. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood.* 2002;99:44-51
38. Levesque J-P, Bendall LJ, Hendy J, Williams B, Simmons PJ. SDF-1 α is inactivated by proteolytic cleavage in the bone marrow of mice mobilized by either G-CSF or cyclophosphamide. *Blood.* 2001;98:831a

39. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;938:36-45, 45-37
40. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001;97:3354-3360
41. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3:687-694
42. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J. Exp. Med.* 1998;187:1439-1449
43. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira D, Kelly M, Naldini L, Dick J. Transduction of human CD34+CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third generation lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2000;1:566-573
44. Miyoshi H, Smith K, Mosier D, Verma I, Torbett B. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999;283:682-686
45. Barquinero J, Segovia J, Ramirez M, Limon A, Guenechea G, Puig T, Briones J, Garcia J, Bueren J. Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *blood.* 2000;3085-3093
46. Woods N, Fahlman C, Mikkola H, Hamaguchi I, Olsson K, Zufferey R, Jacobsen S, Trono D, Karlsson S. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood.* 2000;96:3725-3733
47. Sutton R, Reitsma M, Uchida N, Brown P. Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J Virol.* 1999;73:3649-3660
48. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile G. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669-672
49. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Morteollaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucchi F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo M, Bordignon C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloblastic conditioning. *Science.* 2002;296:2410-2413
50. Darash-Yahana M, Kahn J, Aslan H, Gropp M, Nagler A, Gazit Z, Reubinoff B, Lapidot T, Gazit D, Galun E, Peled A. Rapid and efficient lentiviral mediated transduction of human mesenchymal and hematopoietic stem cells. Submitted. 2003
51. Wagstaff M, Lilley C, Smith J, Robinson M, Coffin R, Latchman D. Gene transfer using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 1998;5:1566-1570
52. Metcalf D. Haemopoietic colonies: In vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results in Cancer Res.* 1977;61:1
53. Gibellini D, Bassini A, Re MC, Ponti C, Miscia S, Gonelli A, La Placa M, Zauli G. Stroma-derived factor 1 alpha induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol.* 2000;111:432-440
54. Bleul CC, Aiuti A, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of Experimental Medicine.* 1996;184:1101-1109
55. Signoret N, Oldbridge J, Perchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* 1997;139:651-664

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para preparar una población de células que comprende células madre hematopoyéticas enriquecidas con progenitores primitivos inmaduros, comprendiendo el método introducir en las células madre recogidas un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.
- 5 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de células exhibe una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o menor que aproximadamente 50 ng/ml.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de células exhibe una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de células exhibe una reducción en la desensibilización por parte de SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los progenitores primitivos inmaduros son del linaje CD34⁺/CD38^{-low}.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células madre se recogieron después de haber inducido un proceso de movilización de células madre y/o mediante un proceso quirúrgico.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, aislar mediante FACS células madre que tienen niveles de CXCR4 por encima de un umbral predeterminado.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células madre son capaces de diferenciarse hacia los linajes mieloide y eritroide.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente 1-5% de la población.
- 25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que los progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} están en una cantidad igual o superior a aproximadamente 3% de la población.
11. Una población de células que comprende células madre hematopoyéticas enriquecidas con progenitores primitivos inmaduros, que exhiben una migración de células potenciada inducida por SDF-1 en respuesta a una concentración de SDF-1 que es igual a o menor que aproximadamente 50 ng/ml, o que es igual a o mayor que aproximadamente 1 µg/ml, preparada al introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4, dando como resultado una sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.
- 30 12. La población de células de acuerdo con la reivindicación 11, que es capaz de diferenciar hacia los linajes mieloide y eritroide.
13. La población de células de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros son del linaje CD34⁺/CD38^{-low}.
- 35 14. La población de células de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente 1-5% de la población.
15. La población de células de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la cantidad de progenitores primitivos inmaduros del linaje CD34⁺/CD38^{-low} es aproximadamente o superior a 3% de la población.
- 40 16. Uso de una población de células que comprende células madre hematopoyéticas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la fabricación de un medicamento para aumentar el traslado de las células madre hematopoyéticas a un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
17. Uso de una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la fabricación de un medicamento para aumentar la repoblación de un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- 45 18. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 16 ó 17, en donde dicho tejido diana se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, vasos sanguíneos, corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, sistema nervioso, piel, hueso y músculo esquelético.
19. Uso de una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la fabricación de un medicamento para facilitar el trasplante.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho trasplante sigue protocolos de quimioterapia.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho trasplante es autólogo.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el trasplante implica la movilización de células autólogas.
23. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el trasplante es heterólogo.
- 5 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el trasplante se lleva a cabo con células madre movilizadas.
25. Una población de células que comprende células madre hematopoyéticas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para uso en aumentar el traslado de las células madre hematopoyéticas a un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
- 10 26. Una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para uso en aumentar la repoblación de un tejido diana en un sujeto que lo necesita.
27. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en donde dicho tejido diana se selecciona del grupo que consiste en médula ósea, vasos sanguíneos, corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón, sistema nervioso, piel, hueso y músculo esquelético.
- 15 28. Una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para uso en facilitar el trasplante.
29. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el trasplante sigue protocolos de quimioterapia.
30. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde dicho trasplante es autólogo.
- 20 31. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el trasplante implica la movilización de células autólogas.
32. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el trasplante es heterólogo.
- 25 33. La población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para el uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el trasplante se lleva a cabo con células madre movilizadas.
34. Un método *in vitro* para preparar una población de células que comprenden células madre hematopoyéticas que exhiben CXCR4 con un epítipo 6H8 intacto, comprendiendo el método introducir en las células madre un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4.
- 30 35. Una población de células que comprenden células madre hematopoyéticas que comprenden un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparado al introducir un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4 en las células madre, dando como resultado la sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.
36. Uso de una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en la fabricación de un medicamento para el trasplante.
37. Una población de células de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para uso en el trasplante.
- 35 38. Una composición farmacéutica que comprende una población de células hematopoyéticas que comprenden células madre que exhiben un epítipo 6H8 intacto de CXCR4, preparado al introducir un fragmento de ADN que comprende la secuencia de CXCR4 en las células madre, dando como resultado la sobre-expresión de CXCR4 en las células madre.

FIGURA 1

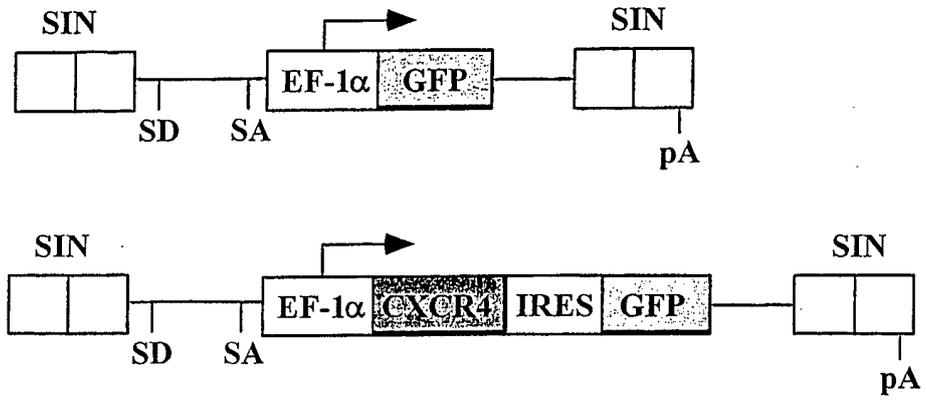


Figura 2

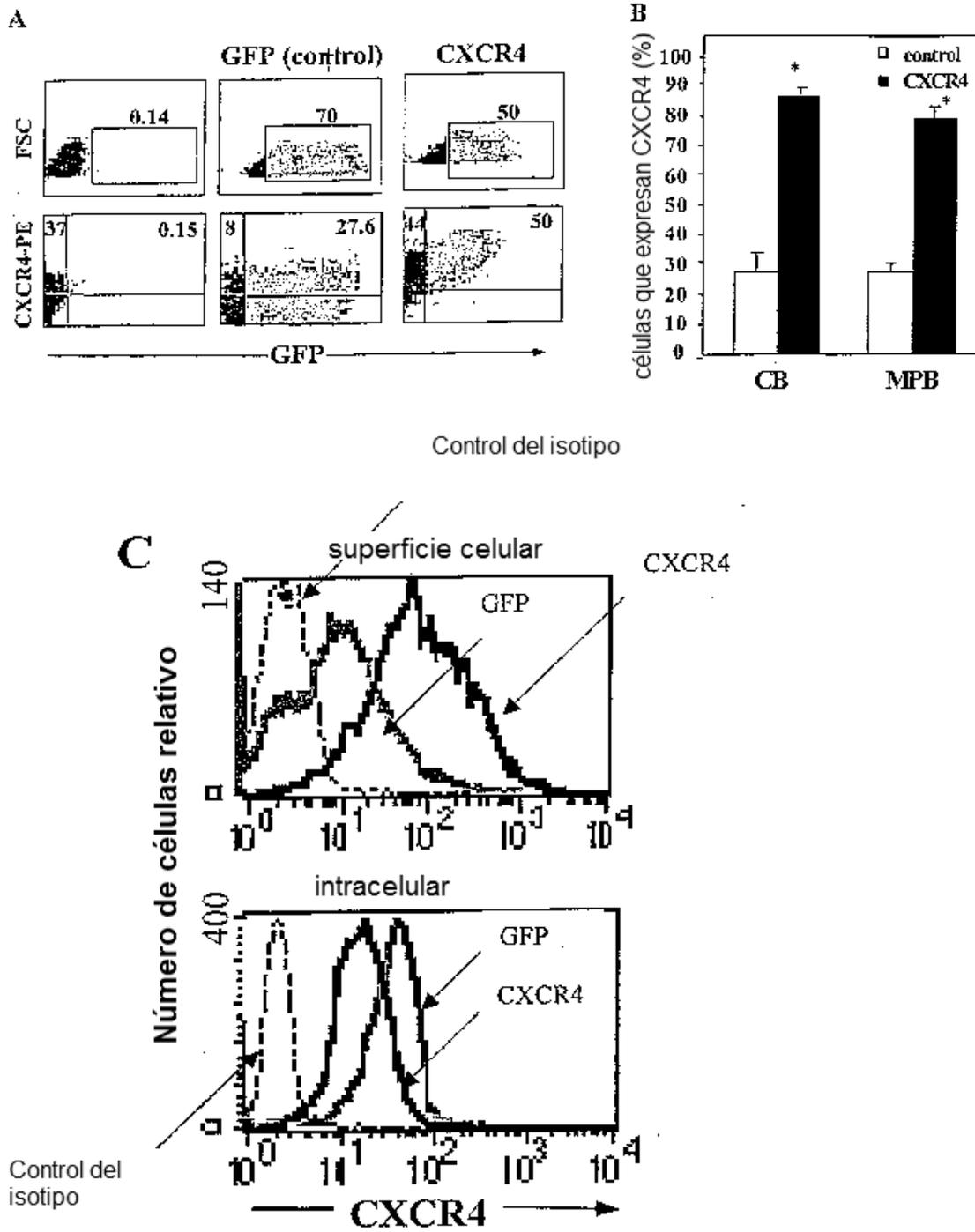


Figura 3:

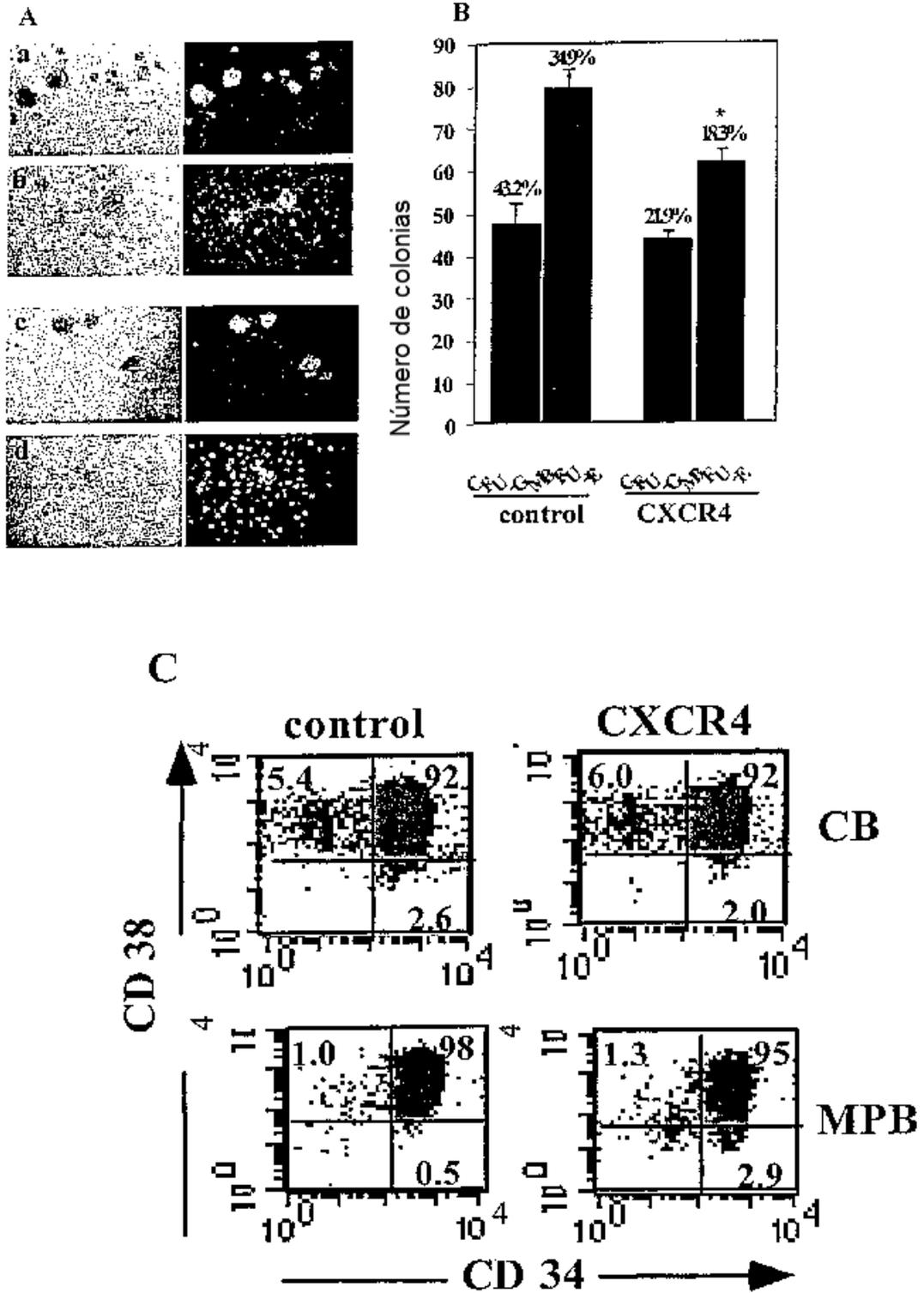


Figura 4

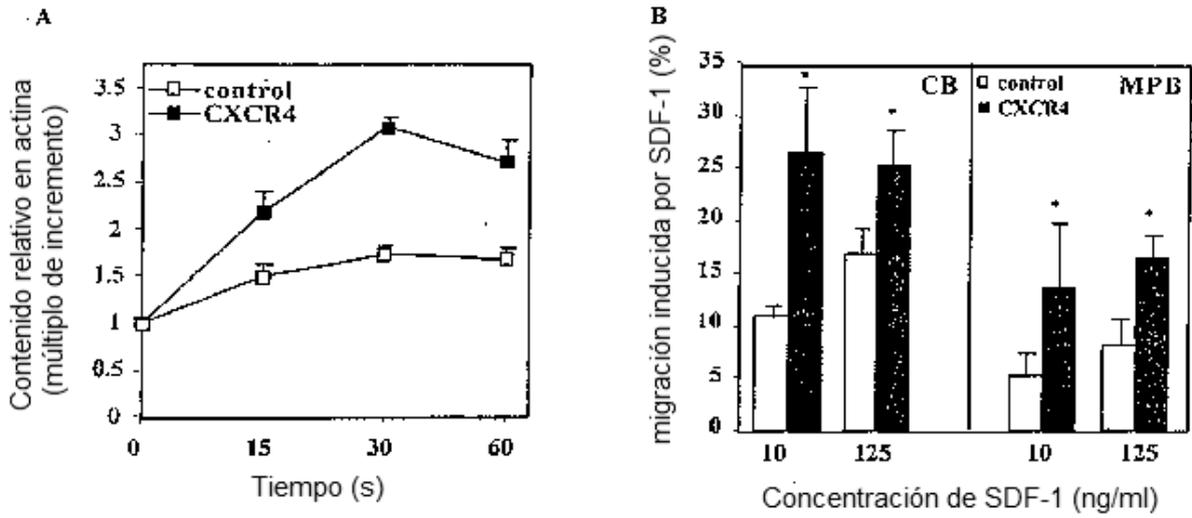


Figura 5:

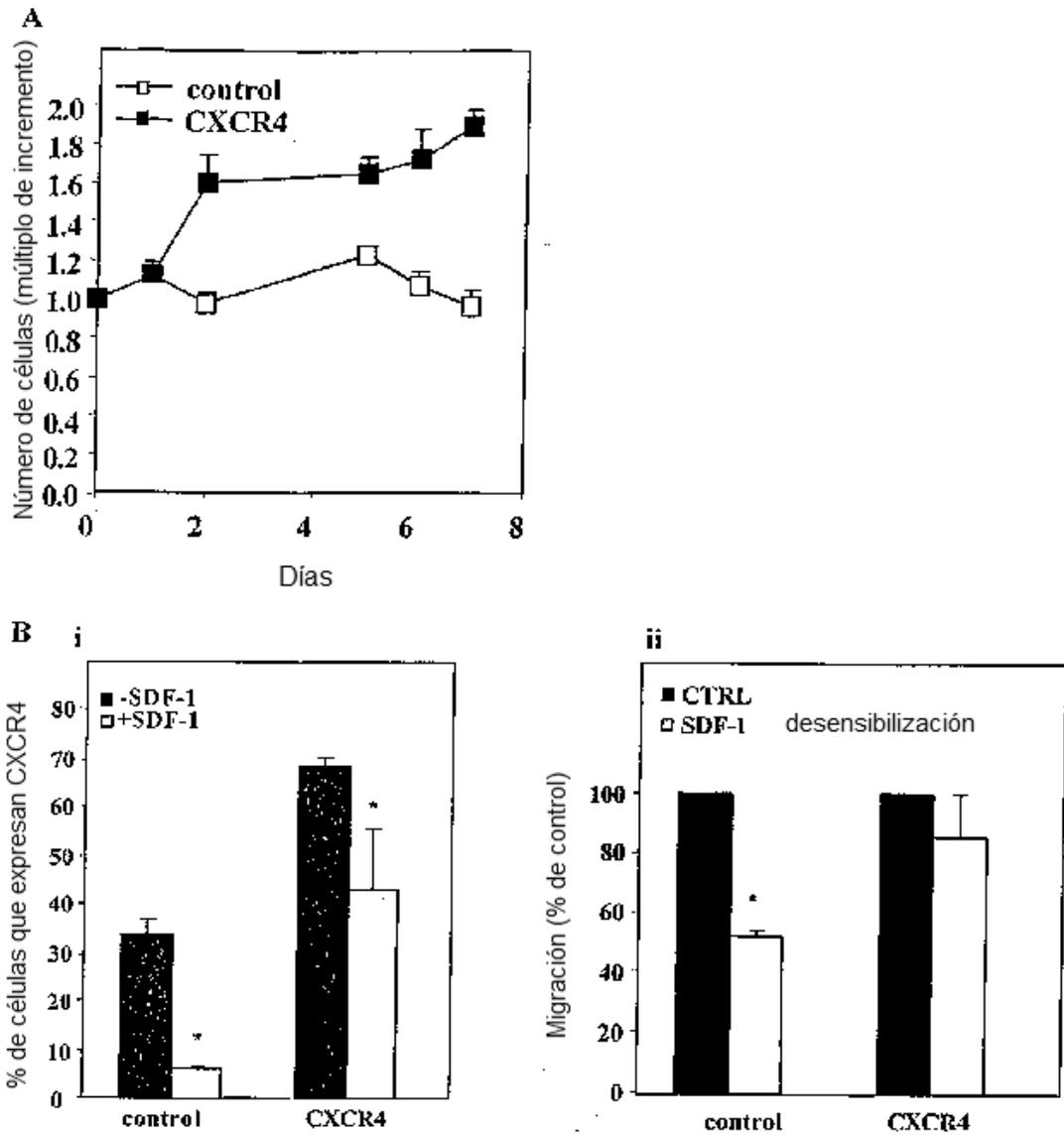


Figura 6

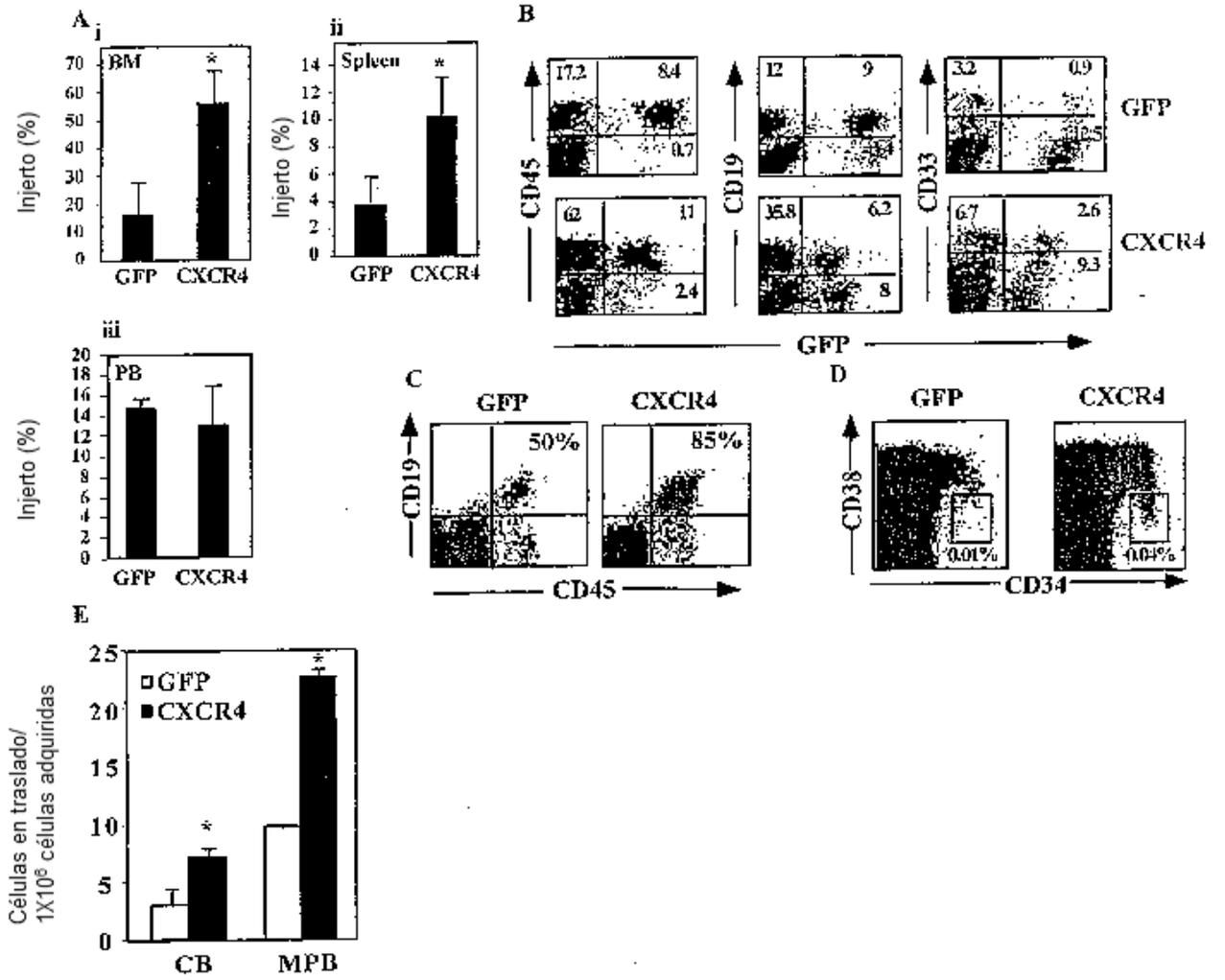


Figura 7

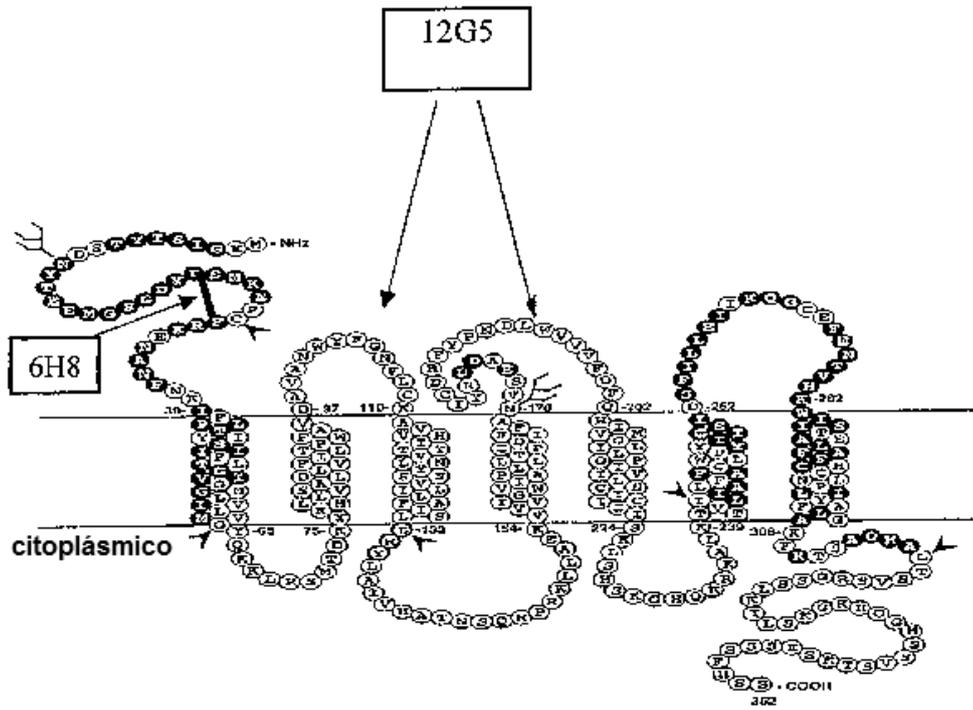


Figura 8

